

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
- Lehrstuhl II -
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. F. Schneider

UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFNAHME UND
VERTEILUNG DES SEROTONINS IN SYNAPTOSOMEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von —

GABRIELE WILDENHAHN
—
aus Stuttgart

Marburg 1976
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
- Lehrstuhl II -
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. F. Schneider

UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFNAHME UND
VERTEILUNG DES SEROTONINS IN SYNAPTOSOMEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GABRIELE WILDENHAHN
aus Stuttgart

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 27.9.1976

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Professor Dr. F. Neurath
Referent: Professor Dr. W. Wesemann
Correferent: Dozent Dr. R. Braun

INHALTSTABELLE

1. Einleitung

1.1. Zusammenfassung

Herrn Professor Dr. W. Wesemann danke ich für die Überlassung des Themas und die mir während der Arbeit gegebenen Ratschläge.

2. Darstellung der Synthesysteme

2.1. Synthesystem der ^{14}C -Markierung

2.2. Synthesystem der ^{14}C -Markierung

2.3. Synthesystem der ^{14}C -Markierung

2.4. Synthesystem der ^{14}C -Markierung

2.5. Synthesystem der ^{14}C -Markierung

3. Darstellung der Synthesysteme

4. Darstellung der Synthesysteme

5. Darstellung der Synthesysteme

6. Darstellung der Synthesysteme

6.1. Darstellung der Synthesysteme

6.2. Darstellung der Synthesysteme

6.3. Darstellung der Synthesysteme

6.4. Darstellung der Synthesysteme

6.5. Darstellung der Synthesysteme

6.6. Darstellung der Synthesysteme

7. Zusammenfassung



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552328_0078

Inhaltsverzeichnis

<u>A. EINLEITUNG</u>	1
<u>B. METHODEN</u>	
1. Chemikalien	8
2. Strukturformeln	8
3. Versuchstiere	9
4. Isolierung der Synaptosomen	9
5. Inkubation der Synaptosomen	10
5.1 Zeitabhängigkeit der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme	11
5.2 Substratabhängigkeit der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme	11
5.3 Hemmung der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme	11
5.4 Sulfhydrylgruppen-Blockade	12
5.5 (^{14}C) 5-HT-Aufnahme in Gegenwart von D-LSD	12
6. Dünnschichtchromatographie	12
7. Isolierung synaptischer Vesikel	13
8. Verteilung des in Synaptosomen aufgenommenen (^{14}C) 5-HT	14
9. Verteilung des aufgenommenen (^{14}C) 5-HT im Cytoplasma der Synaptosomen	15
9.1 Messung der (^{14}C) 5-HT-Bindung	15
9.2 (^{14}C) 5-HT-Bindung im Cytoplasma nach Inkubation der Synaptosomen mit (^{14}C) 5-HT	15
9.3 (^{14}C) 5-HT-Bindung im Cytoplasma nach Inkubation des Cytoplasmas mit (^{14}C) 5-HT	16
10. Elektronenmikroskopie	16

C. ERGEBNISSE

1. Zeitabhängigkeit der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme	17
2. Metabolisierung des aufgenommenen (^{14}C) 5-HT	17
3. Kinetik der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme	19
4. Hemmung der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme	19
4.1 Aminoadamantan	19
4.1.1 1-Aminoadamantan (Amantadin)	20
4.1.2 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145)	23
4.2 SH-Reagenzien	25
4.3 Hemmstoffe des Elektronentransportes	27
4.4 Hemmstoffe der oxidativen Phosphorylierung	28
4.5 Hemmstoffe der Glykolyse	29
4.6 Ouabain	30
4.7 D-LSD	31
5. Verteilung des aufgenommenen (^{14}C) 5-HT in Synaptosomen	33
5.1 Verteilung des (^{14}C) 5-HT während der Isolierung synaptischer Vesikel	33
5.2 Verteilung des (^{14}C) 5-HT in der Vesikelfraktion	34
5.3 Bindung des (^{14}C) 5-HT im Cytoplasma der Synaptosomen	34
5.3.1 Inkubation des Cytoplasmas mit (^{14}C) 5-HT	35
5.3.2 Inkubation der Synaptosomen mit (^{14}C) 5-HT	35
D. DISKUSSION	36
E. ZUSAMMENFASSUNG	46
F. LITERATUR	47

A. EINLEITUNG

Die Neuronen stellen gemäß der Neuronenlehre von S. RAMÓN Y CAJAL (1890) als funktionell hochspezialisierte und cytoplasmatisch differenzierte Zellen mit großem Zellkern und reger Proteinbiosynthese (AKERT, 1971) die Baueinheit des aus einem komplexen Netzwerk bestehenden Nervensystems dar. Der interzelluläre Kontakt wird durch eine unterschiedliche Anzahl von Zellausläufern und -fortsätzen, die aus dem eigentlichen Zellkörper (Perikaryon) entspringen, hergestellt; von den stark verästelten, zum Teil die afferenten Erregungen leitenden Dendriten werden Neuriten (innerhalb der Markscheide "Axone") unterschieden. Diese enden als effektive Leitungsstrukturen an der Oberfläche des nachgeschalteten Neurons, durch einen $300 \text{ \AA}$ breiten Spalt (DE ROBERTIS, 1969) getrennt, mit sogenannten Endkörpern (HELD, 1897) oder Endknöpfchen (AUERBACH, 1897). SHERRINGTON (1897) bezeichnete die gesamte Kontaktzone als Synapse. Das menschliche Gehirn enthält nach Berechnungen von WHITTAKER (1973) etwa 10^{11} Neurone mit 10^{13} bis 10^{14} Synapsen.

Bei vorsichtigem Homogenisieren von Hirngewebe werden die präsynaptischen Nervenendigungen von den Perikaryen abgerissen und bilden geschlossene, im Durchmesser etwa $0,5 \text{ \mu m}$ messende Strukturen, die ihre cytochemischen Eigenschaften weitgehend erhalten haben. Im elektronenmikroskopischen Bild ist manchmal noch ein Teil der Neuriten und, durch intersynaptische Filamente verbunden, der postsynaptischen Membran des nachgeschalteten Neurons sichtbar. Eine erste Präparation und Identifizierung dieser Nervenendigungen, die später von WHITTAKER, MICHAELSON & KIRKLAND, 1964 als "Synaptosomen" bezeichnet wurden, gelang HEBB & WHITTAKER, 1958 durch fraktionierte Zentrifugation und Trennung über Sucrose - Dichtegradienten.

Synaptosomen sind gleich kernfreien Zellen umschlossen von einer Membran, die reich ist an $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ und somit zum aktiven Transport z.B. von Na^+ (LING & ABDEL-LATIF, 1968), K^+ (ESCUETA & APPEL, 1969), Ca^{2+} (BLAUSTEIN et al., 1972), Glucose (WHITTAKER, 1973) und anderer Substanzen befähigt ist. Ein hoher Anteil an Lactatdehydrogenase im Synaptosomencytoplasma, der bei Zerstörung der Zellen in hypoosmotischem Medium freigesetzt wird (JOHNSON & WHITTAKER, 1963; MARCHBANKS, 1967), läßt auf ein vollständiges Abreißen vom Axon und somit auf ein ungestörtes Enzymmuster im Cytoplasma schließen. Damit übereinstimmend sind Synaptosomen in physiologischem Medium in der Lage, mit Glucose als Substrat bis zu 90 Minuten linear Sauerstoff aufzunehmen und energiereiches Phosphat zu bilden, ein Vorgang, der durch NaCN , Jodacetat und hypoosmotische Behandlung unterbrochen wird (BRADFORD, 1969). Weiterhin war schon seit längerer Zeit bei Synaptosomen ein in - vitro - Einbau von (^{14}C) -l- Leucin in Protein, also eine eigenständige Proteinbiosynthese bekannt (MORGAN & AUSTIN, 1968), bis schließlich auch synaptosomale Ribosomen nachgewiesen werden konnten (CUPELLO & HYDÉN, 1975).

Eine wesentliche Bedeutung haben die Synaptosomen bei der Erforschung der Neurotransmitter. Diese Substanzen vermitteln nach der Theorie der chemisch-humoralen Reizimpuls-Übertragung die Weiterleitung der Erregung, indem sie nach Ausschüttung aus den Synaptosomen durch den synaptischen Spalt diffundieren, mit der postsynaptischen Membran in Wechselwirkung treten und eine Hyper- oder Depolarisation auslösen. Substanzen, denen eine Transmitterrolle zugesprochen werden soll, müssen hinsichtlich ihrer Bereitstellung, Freisetzung und Inaktivierung bestimmten Forderungen genügen (SCHADÉ & FORD, 1965):

- a) Sie müssen im präsynaptischen Bereich synthetisiert und gespeichert werden.
- b) Präsynaptische elektrische Stimulierung muß zu einer Freisetzung der Substanzen in den synaptischen Spalt und zu dem hyper- oder depolarisierenden Effekt an der postsynaptischen Membran führen.
- c) Die Substanzen müssen durch Abtransport oder Abbau inaktiviert und aus dem synaptischen Spalt entfernt werden.

Acetylcholin war die zuerst entdeckte Substanz, die diesen Kriterien genügte; daneben wird mittlerweile einer wachsenden Reihe weiterer Substanzen (z.B. Noradrenalin, Dopamin, Serotonin, GABA, Histamin, Glycin, Prolin, Taurin und Glutaminsäure) eine Transmitter-Funktion zugesprochen.

Durch den Nachweis von Enzymen der Transmittersynthese, u.a. der Cholinacetyltransferase (FONNUM, 1967), der Glutamatdecarboxylase (FONNUM, 1968) und der Tryptophandecarboxylase (RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ & DE ROBERTIS, 1964) wurde gezeigt, daß Neurotransmitter nicht ausschließlich im Perikaryon gebildet und durch axonalen Transport zur Nervenendigung gelangen, sondern auch innerhalb der Synaptosomen synthetisiert werden können. Die Speicherung der Transmitter erfolgt außer in einem mutmaßlichen cytoplasmatischen Kompartiment (SHIELDS & ECCLESTON, 1973) in Speichergranula, den synaptischen Vesikeln. Diese sind in hypoosmotischem Medium weitgehend stabil (WHITTAKER, 1969) und können durch osmotischen Schock der Synaptosomen und anschließende fraktionierte und Dichtegradientenzentrifugation angereichert werden. Die ersten geeigneten Isolierungsmethoden wurden in den Arbeitsgruppen von V.P. WHITTAKER und E. DE ROBERTIS entwickelt. Nach dem elektronenmikroskopischen Bild variieren die Vesikel in der Größe ($450 \text{ \AA}$ bis $1700 \text{ \AA}$) und können nach ihrem Aussehen eingeteilt werden in a) optisch dichte,

b) umhüllte, c) optisch leere, d) längliche Vesikel. Der Gestaltenreichtum der Vesikel spiegelt teilweise den unterschiedlichen Gehalt an Neurotransmittern wieder - adrenerge Vesikel wurden als granulierte Organellen mit einem mittleren Durchmesser von $1300 \text{ \AA}$ beschrieben (DE ROBERTIS, 1966), acetylcholinhaltige Vesikel dagegen als $500 \text{ \AA}$ große, optisch leere Organellen. Aufgrund kombinierter morphologisch-elektrophysiologischer Studien sollen ellipsoide Vesikel vornehmlich an inhibitorischen Synapsen und runde Vesikel an excitatorischen Synapsen lokalisiert sein (UCHIZONO, 1965). Die Herkunft der synaptischen Vesikel ist bis heute ungeklärt. Nachgewiesen wurde eine ständige Neubildung adrenerger Granula im Perikaryon adrenerger Neuronen und schneller axoplasmatischer Transport mit einer Geschwindigkeit von $5 - 6 \text{ mm/h}$ (DAHLSTRÖM & HÄGGENDAL, 1966). Daneben wurde allerdings auch eine Vesikelbildung durch Abschnürung der präsynaptischen Plasmamembran beobachtet (TURNER & HARRIS, 1973; JØRGENSEN & MELLERUP, 1974).

Neben einem niedermolekularen Protein (Molekulargewicht ~ 10.000), dem Vesikulin (WHITTAKER, 1971), enthalten synaptische Vesikel eine Mg^{2+} - Ca^{2+} -aktivierte ATPase (GERMAIN & PROULX, 1965); die Funktionen beider Proteine sind bisher nicht bekannt. ATP konnte vorerst nur in cholinergen Vesikeln aus dem elektrischen Organ des Tintenfisches *Torpedo marmorata* (WHITTAKER, 1973) und in adrenergen Vesikeln aus sympathischen Nerven nachgewiesen werden (LAGERCRANTZ et al., 1975).

Die Bestimmung der Neurotransmitter-Konzentration in Vesikeln gelang zuerst bei Acetylcholin. Die errechnete Zahl von 10^3 bis 10^4 Acetylcholin-Molekülen pro Vesikel (WHITTAKER & SHERIDAN, 1965) zeigte gute Übereinstimmung mit der Theorie von B. KATZ, nach der Acetylcholin in Quan-

ten von 10^3 bis 10^4 Molekülen in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden muß, um an der postsynaptischen Membran ein Miniaturendplattenpotential erzeugen zu können (KATZ, 1971).

Die Kenntnisse über andere Neurotransmitter in Vesikeln sind im Vergleich zu Acetylcholin bisher gering. 1964 beschrieben MAYNERT et al. eine Anreicherung von Noradrenalin und 5-Hydroxytryptamin in der Fraktion synaptischer Vesikel und 1969 folgte von WESEMANN eine Arbeit über die Isolierung serotoninhaltiger Vesikel aus Rattenhirn. Die Auftrennung synaptischer Vesikel entsprechend dem gespeicherten Transmitter hat sich allerdings bisher als äußerst schwierig erwiesen.

5-Hydroxytryptamin (5-HT) ist pharmakologisch schon lange bekannt als vasokonstriktorisches Substrat unter dem Namen Vasotonin bzw. als Enteramin der Enterochromaffinen Granula in der Darmmucosa. 1948 erhielt die Substanz von RAPPORT, der sie aus dem Serum in kristalliner Form isolierte und wenig später durch Strukturaufklärung als 5-Hydroxytryptamin charakterisierte, den Namen Serotonin. 5-HT ist im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet; auffallend ist der hohe Gehalt im Blutegel (*Hirudo medicinalis*) mit $6,9 \mu\text{g}$ 5-HT pro g Feuchtgewicht (WELSH & MOORHEAD, 1960) und der Kröte *Bufo americanus* mit $9,1 \mu\text{g}$ 5-HT pro g Hirn-Feuchtgewicht (BOGDANSKI et al., 1963). Dagegen liegt der 5-HT-Spiegel im Säugetierhirn sehr niedrig; bei der Ratte wurden im Gesamthirn 0,3 bis 0,6 $\mu\text{g/g}$ Feuchtgewicht (BOGDANSKI, 1956; MAICKEL et al., 1968) gefunden. Enzymatische Microassays (SAAVEDRA et al., 1973) ermöglichten die Bestimmung des 5-HT-Gehaltes in einzelnen Hirnregionen. Die Epiphyse, wo 5-HT in circadianem Rhythmus zu Melatonin metabolisiert wird, weist mit $73 \mu\text{g}$ pro g Gewebe einen extrem hohen Gehalt auf.

In der Reihe abnehmender Konzentration folgen die Raphekerne, Hypothalamus, Mittelhirn, Hirnstamm, Striatum, Cortex; die Verteilung des Serotonin korreliert mit der Verteilung der Tryptophanhydroxylase-Aktivität (DEGUCHI & BARCHAS, 1972).

Mit Hilfe histochemischer Fluoreszenzmethoden (DAHLSTRÖM & FUXE, 1964) konnte Serotonin in Neuronen vornehmlich der *Formatio reticularis* und der Raphe-Region nachgewiesen werden.

Die Erfüllung der Neurotransmitter-Kriterien hinsichtlich der Freisetzung und Aufnahme wurde an Gehirnschnitten (Gesamthirn bzw. Einzelregionen) und Synaptosomen untersucht.

Radioaktiv markiertes inkorporiertes 5-HT wird durch Depolarisation der präsynaptischen Membran mittels elektrischer Reizung oder hoher Kaliumionenkonzentration im Medium aus Synaptosomen freigesetzt (WESEMANN, 1974; SHIELDS & ECCLESTON, 1973). Weiterhin wird die Freisetzung von 5-HT aus Synaptosomen durch verschiedene Pharmaka (z.B. Reserpin) beschrieben.

Die ersten Studien über eine 5-HT-Aufnahme in Hirnschnitte oder Synaptosomen (SCHANBERG, 1963; ROBINSON et al., 1965) ergaben keinen Anhaltspunkt für einen aktiven Transport. Demgegenüber beschrieben MARCHBANKS (1966) und BLACKBURN et al. (1967) eine temperatur-, pH- und puffermilieuabhängige spezifische Bindung bzw. Aufnahme. Die physiologische Bedeutung dieser 5-HT-Aufnahme im Sinne einer Inaktivierung nach Freisetzung in den synaptischen Spalt wird unterschiedlich beurteilt: Während IVERSEN (1974) die Funktion der 5-HT-Aufnahme als "noch unklar" bezeichnet, diskutieren MANDELL et al. (1974) zwei Möglichkeiten der 5-HT-Inaktivierung: Sie fanden erstens eine Korrelation zwischen der regionalen Verteilung der 5-HT-Synthese und der Aktivi-

tät der aromatischen Alkylamin-N-methyltransferase (AANMT), die mit N-5-Methyltetrahydrofolsäure als Methylgruppendonator 5-HT in die weniger aktiven N-Methylderivate umsetzt; das Enzym konnte im extrasynaptosomalen Bereich nachgewiesen werden. Die Inaktivierung durch Aufnahme in die Synaptosomen betrachten die Autoren jedoch als dominierend.

Die 5-HT-Aufnahme kann durch verschiedene psychotrope Substanzen gehemmt werden. Zu den wirksamsten gehören tricyclische Antidepressiva wie Imipramin (Tofranil^R) und seine Chlor- und Desmethylnachkömmlinge oder die Dibenzocycloheptadienderivate Amitryptilin und Nortryptilin (SHASKAN & SNYDER, 1970), sowie Cocain, Amphetamine (ROSS & RENYI, 1969) und das Opiat Methadon (CIOFALO, 1974). Zu den schwächeren Hemmstoffen zählen Strukturanaloga des 5-HT wie Tryptophan und seine Methyl- und Äthylderivate (ROSS & RENYI, 1969).

Am Thrombozyten, einer häufig mit Synaptosomen verglichenen Modell-Zelle, bewirkt außerdem das antivirale (Influenza A₂) und in der Therapie des Morbus Parkinson gebräuchliche Pharmakon 1-Aminoadamantan eine Aufnahme-Hemmung des Serotonins (LEMMER, 1973).

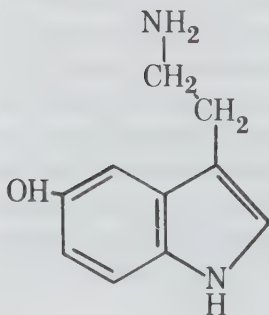
Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der Aufnahmekinetik des Serotonins in isolierte Nervenendigungen, ihre Energieabhängigkeit (ATP-Bildung, Atmung und Glykolyse) sowie die Beeinflussung durch Sulfhydrylgruppen-Blockade (Oxidation, Mercaptidbildung bzw. Alkylierung). Weiterhin wurde die Selektivität des Transportes mit D-LSD überprüft und in Anlehnung an die Befunde bei Thrombozyten die Wirkung des 1-Aminoadamantan und des 3,5-Dimethylderivates D 145 untersucht. Da, wie bereits oben erwähnt, der Mechanismus der Serotonininkorporation in synaptische Vesikel ungeklärt ist, wurde auch die Kompartimentierung des durch die Synaptosomen aufgenommenen Serotonins untersucht.

B. METHODEN

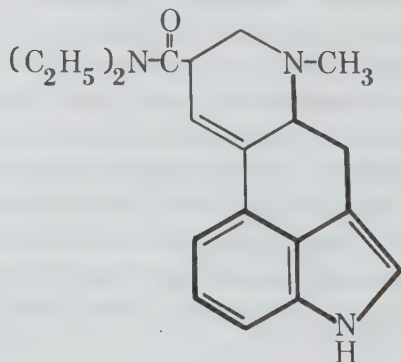
1. Chemikalien

5-Hydroxytryptamin, 5-Hydroxyindolessigsäure, Monojodacetat, Mersalyl, NaCN, 2-Deoxy-D-glucose, Natriumhydrogenarsenat, Natriumfluorid und Aktivkohle wurden von der Firma MERCK, Darmstadt, bezogen. Die Firma SERVA, Heidelberg, lieferte Antimycin A, Oligomycin, Valinomycin, o-Jodosobenzoessäure, 2.4-Dinitrophenol und die Firma SIGMA, St. Louis, USA, Jodoacetamid sowie p-Chloromercuriphenylsulfonat-Natrium. Dextran 500 wurde von Firma PHARMACIA, Uppsala, Schweden, und N-Äthylmaleinimid von Firma FLUKA AG, Buchs, Schweiz, bezogen. Die Firmen MERZ & CO., Frankfurt, SANDOZ AG, Nürnberg und HOFFMANN-LA-ROCHE, Grenzach, stellten freundlicherweise 1-Aminoadamantan-HCl und D 145, D-Lysergsäurediäthylamid und Iproniazid zur Verfügung. 5-Hydroxy- (2-¹⁴C)- tryptamin-Kreatininsulfat (spez. Aktivität 55 mCi/mMol) stammte von Firma AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig. Alle übrigen Chemikalien entsprachen p.a.-Qualität.

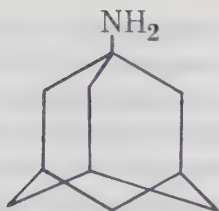
2. Strukturformeln



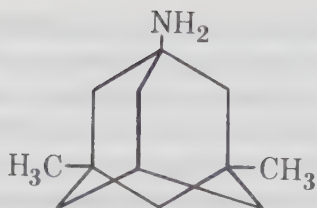
5-Hydroxytryptamin



Lysergsäurediäthylamid



1-Aminoadamantan



1-Amino-3.5-dimethyladamantan

D 145

3. Versuchstiere

Sämtliche Versuche wurden mit männlichen Albino-Ratten (Stamm: Wistar II, 170 - 180 g Körpergewicht) durchgeführt, die freien Zugang zu Standardfutter und Wasser hatten. Die Tötung der Tiere erfolgte stets zu gleicher Tageszeit -morgens zwischen 8 und 9 Uhr- durch Dekapitation.

4. Isolierung der Synaptosomen

Alle nachfolgenden Präparationsschritte wurden bei $+4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Gehirne wurden nach Entfernung der Medulla oblongata und des Kleinhirns in eiskalter Sucrose-Lösung 0.32 M aufgefangen und in einem Glas-Teflon-Potter (15 ml) mit Sucrose-Lösung 0.32 M (10 ml/Gehirn) 2 Minuten homogenisiert (1000 Upm, HEIDOLPH, TYP E 60-RZR, Stufe IV). Da die Ausbeute an Synaptosomen wesentlich von schonenden Homogenisierungs-Bedingungen abhängt (WHITTAKER & DOWE, 1965), betrug der Spielraum zwischen Teflonstempel und

Glaswand 0.25 mm. Die weitere Isolierung erfolgte nach BRADFORD (1972). Die vereinigten Homogenate wurden 10 Minuten bei 880 x g (SORVALL, Rotor SS-34) abzentrifugiert, und der von Zelltrümmern befreite Überstand nochmals 20 Minuten einer Zentrifugation bei 17.000 x g unterworfen. Das Pellet, die sogenannte "Rohe Mitochondrienfraktion", wurde in 36 ml 0.32 M Sucrose-Lösung resuspendiert, in 6 ml-Portionen auf einen diskontinuierlichen Sucrose-Dichtegradienten, bestehend aus je 15 ml 1.2 M und 0.8 M Sucrose, aufgetragen und in einem SW 27-Rotor von BECKMANN 60 Minuten lang bei 75.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt bewirkt eine Abtrennung von Myelin und Mitochondrien und eine Anreicherung der Synaptosomen zwischen der 0.8 M und 1.2 M Schicht. Nach sehr vorsichtiger -um einen osmotischen Schock zu vermeiden- Verdünnung der abgenommenen Synaptosomenfraktion auf 0.45 M Sucrose durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem Wasser unter dauerndem Umschwenken der Suspension und anschließender Zentrifugation (34.800 x g 10 Minuten; SORVALL, Rotor SS-34) befinden sich die Synaptosomen im Pellet.

5. Inkubation der Synaptosomen

Das Pellet wurde bei 37°C in KREBS-Phosphat-Puffer resuspendiert (NaCl 124 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.3 mM, CaCl₂ 0.75 mM, Glucose 10 mM, durch Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) auf pH 7.4 eingestellt), wobei die Proteinkonzentration 0.4 - 0.5 mg/ml betrug. Nach Vorinkubation (37°C, 10 Minuten) wurde die Suspension in 1 ml-Anteilen 3 Minuten mit 10 µl einer 5-Hydroxy-(Seitenkette-2-¹⁴C)-tryptamin-Kreatininsulfat-Lösung (spezifische Aktivität 55 mCi/mMol) unterschiedlicher molarer Endkonzentration wie in den Einzelversuchen angegeben unter weiterer Begasung inkubiert. Parallel hierzu erfolgte zur Ermittlung der unspezifischen 5-HT-Bindung die Inkubation bei 4°C.

Die 5-HT-Aufnahme wurde durch Zentrifugation bei 0°C ($12.000 \times g$, 4 Minuten; EPPENDORF-Zentrifuge) und Abtrennen des Überstandes gestoppt. Das Pellet wurde in 1 ml KREBS-Phosphat-Puffer aufgewirbelt (CENCO WHIRLMIX) und die Synaptosomen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen aufgeschlossen und suspendiert. 0.1 ml jeder Probenlösung dienten zur Proteinbestimmung.

Die Aktivität der Lösung wurde nach Zugabe von NCS-Tissue solubilizer (Firma Nuclear Chicago; 0.5 ml zu 0.5 ml Probenlösung) und Inkubation (50°C , 30 Minuten) in 15 ml Scintillationsflüssigkeit (BRAY, 1960) gegen einen externen Standard gemessen (PACKARD Tri-carb Scintillations-Spektrometer, Mod. 3380/544). Die Bestimmung des Proteingehaltes jeder Probe erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951).

5.1 Zeitabhängigkeit der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme

Je 1 ml Synaptosomensuspension wurden 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 und 30 Minuten mit 10 μl einer (^{14}C) 5-HT-Lösung (Endkonzentration: $5 \times 10^{-7}\text{M}$) wie oben angegeben inkubiert. Die Inkubation erfolgte zusätzlich mit zuvor hitzeexponierten Synaptosomen (100°C , 15 Minuten).

5.2 Substratabhängigkeit der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme

Die Aufnahmekinetik wurde durch Inkubation mit (^{14}C) 5-HT-Konzentrationen im Bereich $1 \times 10^{-8}\text{M}$ bis $1 \times 10^{-6}\text{M}$ bestimmt. Die (^{14}C) 5-HT-Zugabe erfolgte wie oben in 10 μl .

5.3 Hemmung der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme

In Versuchen mit Hemmstoffen der 5-HT-Aufnahme ging der Inkubation (37°C bzw. 4°C , 3 Minuten) mit (^{14}C) 5-HT (Endkonzentration $1 \times 10^{-7}\text{M}$) je eine Vorinkubation (37° bzw. 4°C ,

10 Minuten) mit einer Stammlösung der betreffenden Hemmsubstanz in KREBS-Phosphat-Puffer voraus. Die nachfolgenden, in wässrigem Milieu unlöslichen Antibiotika Antimycin A, Oligomycin und Valinomycin wurden in absolutem Äthanol gelöst, wobei die Konzentration der anzusetzenden Lösung so gewählt wurde, daß die Äthanol-Endkonzentration pro Inkubationsgefäß 1% (10 µl/ml) betrug. In die Kontrollproben wurden 10 µl/ml absoluter Äthanol pipettiert.

5.4 Sulfhydrylgruppenblockade

Da in der Regel Substanzen, die Sulfhydrylgruppen blockieren, längere Inkubationszeiten erfordern, wurden in diesen Versuchen die Synaptosomen zunächst mit SH-Blockern bei 0°C 1 Stunde vorinkubiert, anschließend innerhalb 10 Minuten auf 37°C bzw. 4°C temperiert und schließlich, wie oben angegeben, 3 Minuten (37°C bzw. 4°C) mit (^{14}C)5-HT ($1 \times 10^{-7}\text{M}$) inkubiert.

5.5 5-HT-Aufnahme in Gegenwart von D-LSD

In Versuchen mit Lysergsäurediäthylamid (D-LSD) wurden nach 10 Minuten Vorinkubation der Synaptosomensuspension bei 37°C bzw. 4°C Hemmstofflösung und (^{14}C)5-HT-Lösung simultan mit der Suspension vermischt und 3 Minuten inkubiert.

6. Dünnschichtchromatographie

Synaptosomen wurden in KREBS-Phosphat-Puffer 10 Minuten mit bzw. ohne Iproniazid (6 mM) vorinkubiert und weitere 3 Minuten mit (^{14}C)5-HT behandelt. Nach dem Abzentrifugieren bei 0°C und 12.000xg wurde das Pellet nach KUCHAR et al. 1972 in 80prozentigem Äthanol 10 Minuten in der Kälte ex-

trahiert und nochmals abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde unter Stickstoff eingeengt und auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, MERCK) aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen dienten Serotonin-Kreatininsulfat und 5-Hydroxyindolessigsäure. Das Fließmittel setzte sich zusammen aus Acetessigester-n-Propanol-28% Ammoniak (45:35:20); die Laufstrecke betrug 15 cm. Zur Ermittlung der Radioaktivitätsverteilung auf der DC-Platte wurden 0.5 cm breite Banden der Kieselgelschicht abgekratzt, mit Scintillationsflüssigkeit versetzt und die Aktivität im Tri-carb-Scintillationsspektrometer gemessen. Die Vergleichssubstanzen konnten unter UV-Licht lokalisiert werden.

7. Isolierung synaptischer Vesikel

Die Präparation (WESEMANN, 1969) erfolgte zunächst, wie bei der Isolierung der Synaptosomen beschrieben. Das erste Pellet (880xg, 10 Minuten) wurde jedoch zweifach durch Resuspendierung in 0.32 M Sucrose ausgewaschen (880xg, 10 Minuten) und anschließend verworfen. Die vereinigten Überstände wurden 20 Minuten bei 11.300xg abzentrifugiert und das entstandene Pellet nochmals durch Resuspendieren in 40 ml 0.32M Sucrose und Abzentrifugieren bei 11.300xg ausgewaschen. Das gereinigte Pellet (Synaptosomen und Mitochondrien) wurde 5 Minuten bei 20°C in Wasser gepottert und somit einem osmotischen Schock unterworfen. Nach Entfernung der Membranfragmente (11.300xg, 20 Minuten) wurde aus dem Überstand durch Zentrifugation (106.000xg, 30 Minuten) die sogenannte "Rohe Vesikelfraktion" als Pellet gewonnen, in 12 ml (1 ml/Gehirn) eiskaltem Wasser aufgenommen, sehr fein suspendiert und je 6 ml auf 30 ml 0.4 M Sucrose geschichtet. Die gereinigten Vesikel wurden nach Zentrifugation (54.800xg, 2 Stunden) in einer Zone unterhalb der Grenzschicht zwischen Wasser und

Sucrose entnommen und zur Erlangung eines Vesikelpellets nach Verdünnung der Fraktion mit Wasser (ca. 2:1) abzentrifugiert (144.000xg, 30 Minuten).

8. Verteilung des in Synaptosomen aufgenommenen (^{14}C) 5-HT

Isolierte Synaptosomen wurden in KREBS-Phosphat-Puffer pH 7.4 suspendiert und 10 Minuten mit dem Monoaminoxidase-Hemmstoff Iproniazid (6 mM) unter Begasung mit Carbogen bei 37°C vorinkubiert. Dieser Vorinkubation schloß sich, unter weiterer Begasung, eine Inkubation (30 Minuten) mit (^{14}C) 5-HT (Endkonzentration: 10^{-6}M) an. Die Kontrolle der Gesamt-Radioaktivität erfolgte, wie auch in den nachfolgenden Isolierungsschritten, stets durch Abnahme geeigneter Proben. Nach Beendigung der Inkubation durch Zentrifugation (17.000xg, 10 Minuten) wurde das Synaptosomenpellet je nach Versuchserfordernissen in unterschiedlicher Weise einem osmotischen Schock unterworfen: Das Synaptosomenpellet wurde 5 Minuten bei 20°C gepottert: entweder in Wasser (5 ml/g Hirnfrischgewicht) oder aber in 40 ml TRIS-EDTA-Puffer 5 mM, pH 6,5 (MARCHBANKS, 1968) mit Zusatz von 5-HT $5 \times 10^{-7}\text{M}$. Die Entfernung der Membranfragmente, Synaptosomenreste und Mitochondrien erfolgte wie oben beschrieben (11.300xg, 20 Minuten); aus dem Überstand wurde durch Zentrifugation (106.000xg, 30 Minuten) die rohe Vesikelfraktion gewonnen, in 6 ml Wasser bzw. TRIS-EDTA-Puffer 5 mM, pH 6.5 mit 5-HT $5 \times 10^{-7}\text{M}$ resuspendiert und auf 30 ml 0.4 M Sucrose geschichtet. Der Gradient wurde 2 Stunden bei 54.800xg zentrifugiert und anschließend nach Anstechen des Zentrifugenröhrchenbodens mit einer Kanüle (Nr. 2, Ø: 0.8 mm) tropfenweise (40 Tropfen pro Fraktion) fraktioniert. Eine gleichmäßige Tropfengröße und Tropfgeschwindigkeit war durch Anschluß einer Schlauchpumpe gewährleistet. Die Radioaktivität und UV-Absorption (280 nm) jeder Fraktion wurden bestimmt.

9. Bestimmung der Verteilung des aufgenommenen

(^{14}C) 5-HT im Cytoplasma der Synaptosomen

9.1 (^{14}C) 5-HT-Bindungsassay

Proteingebundenes (^{14}C) 5-HT wurde mit Hilfe einer Kohlead-sorptionstechnik bestimmt, die von HEYNS et al. (1967) und KORENMAN (1968) für Bindungsstudien von Steroiden an Protein eingeführt und von DETTE & WESEMANN (1975) zur Bindung von 5-HT an Membranproteine verwertet worden war. 500 μl (^{14}C) 5-HT-haltiger Proteinlösung wurden mit 100 μl einer 6prozentigen Aktivkohle-Suspension (0,6% Dextran-Zusatz) versetzt und 10 Sekunden mit einem Cenco-Whirlmix gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten und Entfernung der Kohle (2.500xg, 2 Minuten) wurden vom klaren Überstand 500 μl abgenommen, mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit (BRAY, 1960) versetzt und die Radioaktivität gemessen. Die Blankwert-Korrektur erfolgte durch parallel behandelte proteinfreie Ansätze mit Pufferlösung gleichen (^{14}C) 5-HT-Gehaltes.

9.2 (^{14}C) 5-HT-Bindung im Cytoplasma nach Inkubation der Synaptosomen mit (^{14}C) 5-HT.

Isolierte Synaptosomen von 6 Gehirnen wurden in KREBS-Phosphat-Puffer, pH 7.4 suspendiert und nach Iproniazid (6 mM)-Vorinkubation (37°C, 10 Minuten) mit (^{14}C) 5-HT (Endkonzentration $1 \times 10^{-6}\text{M}$) unter Carbogen-Begasung inkubiert (37°C, 30 Minuten) und anschließend abzentrifugiert (17.300 x g, 10 Minuten). Die Durchführung des osmotischen Schocks erfolgte auf zweierlei Weise:

1. durch Pottern (5 Minuten) des Pellets in 5 mM TRIS-EDTA-Puffer, pH 6.5 bei 20°C; um eine hohe Protein-Konzentration im Cytoplasma-Überstand (106.000 x g, 1 Stunde) zu erhalten wurden pro g Gehirn-Feuchtgewicht 2 ml Puffer eingesetzt (WHITTAKER et al., 1964).
2. Bei der anderen angewandten Methode (TAMIR & HUANG, 1974) wurden die Synaptosomen in 0.02 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.5 aufgenommen im Wechsel 10mal eingefroren und aufgetaut und wie oben abzentrifugiert.

Zur Blankwert-Kontrolle im Kohleassay wurde stets eine Pufferlösung mit (^{14}C)5-HT entsprechend der Aktivität eines 500 µl-Aliquots der Cytoplasma-Probe eingestellt.

9.3 (^{14}C)5-HT-Bindung im Cytoplasma nach Inkubation des Cytoplasmas mit (^{14}C)5-HT

Isolierte Synaptosomen (Proteinkonzentration 2-3 mg/ml) wurden in KREBS-Phosphat-Puffer, pH 7.4 40 Minuten bei 37°C mit Iproniazid (6 mM) inkubiert und anschließend abzentrifugiert (17.300 x g, 10 Minuten). Der osmotische Schock wurde in 5 mM TRIS-EDTA-Puffer, pH 6.5 (2 ml/g Gehirn-Feuchtgewicht) durchgeführt (20°C, 5 Minuten). Der Überstand aus der nachfolgenden Zentrifugation (106.000 x g, 1 Stunde) wurde bei einigen Versuchen unmittelbar mit $2 \times 10^{-7}\text{M}$ (^{14}C)5-HT 30 Minuten inkubiert, bei anderen jedoch nach 12stündiger Dialyse gegen 0.02 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5 (TAMIR & HUANG, 1974). Zur Ermittlung des proteingebundenen (^{14}C)5-HT-Anteiles wurden stets 500 µl im Kohleassay eingesetzt.

10. Elektronenmikroskopie

Synaptosomen- oder Vesikelsuspensionen wurden 1 Stunde bei 4°C in einer 3prozentigen Glutaraldehyd-Lösung in 0.1 M Phosphatpuffer (Sörensen) und anschließend mit einer gepuf-

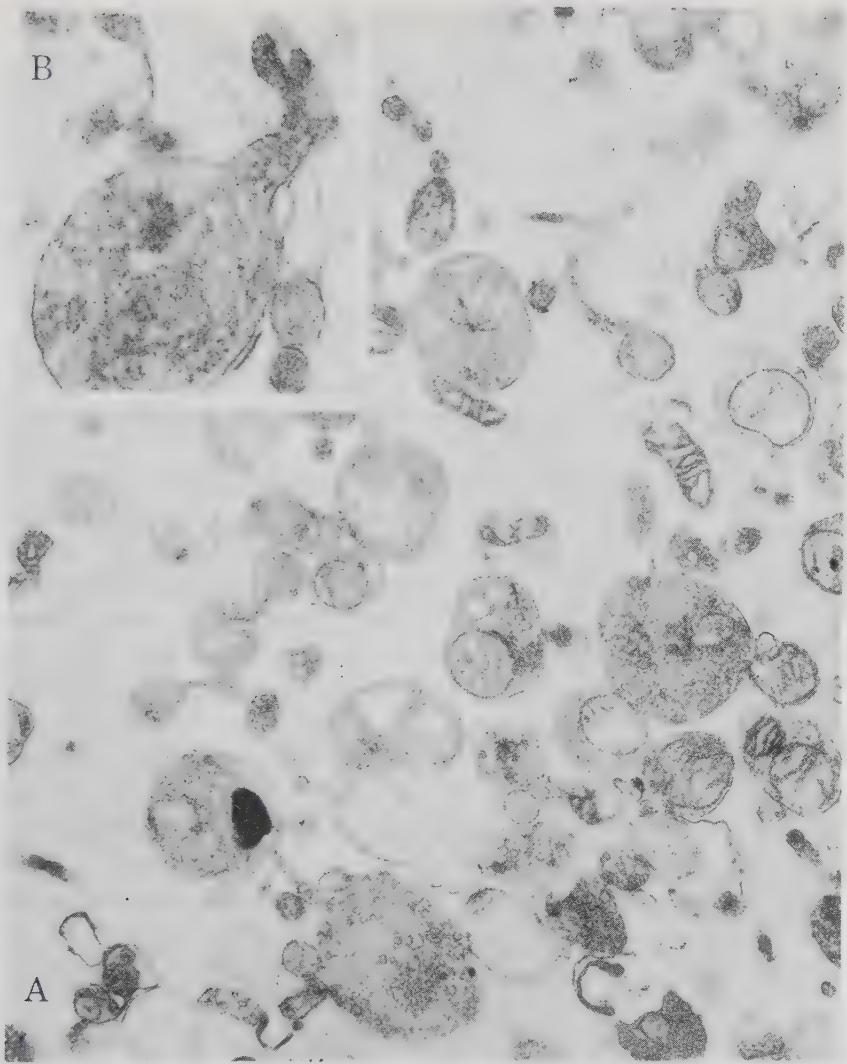


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme isolierter Synaptosomen:

Das Synaptosomenpellet wurde in gepufferter Glutaraldehydlösung (3%) und in Osmiumtetroxid fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Epon eingebettet.

Bild A: Vergrößerung: 1 : 30.000

Bild B: Synaptosom mit anhaftendem Axonbruchstück (1 : 60.000)

ferten Osmiumtetroxid-Lösung (1%) fixiert. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Pellets in Epon eingebettet. Die Untersuchung erfolgte mit einem ELMI-SCOP I, SIEMENS. Die Elektronenmikroskopie wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Norbert Paul (Institut für Cytophysiologie, Marburg) durchgeführt.

C. ERGEBNISSE

1. Zeitabhängigkeit der (^{14}C)5-HT-Aufnahme in Synaptosomen

Während der Inkubation der Synaptosomen mit (^{14}C)5-HT über eine Zeitspanne von 1 bis 30 Minuten erfolgte bei 37°C zunächst innerhalb der ersten Minute eine rasche Aufnahme, die dann zunehmend langsamer anstieg und schließlich bei 10 Minuten ein Sättigungsplateau erreichte (Abb. 2). Zur Erfassung der unspezifischen Aufnahme wurde gleichzeitig in Eis unter identischen Bedingungen inkubiert; dieser unspezifische Anteil verkörpert im Aufnahme-Zeit-Diagramm als zeitunabhängige Funktion eine Abszissenparallele. Synaptosomen, die vor der Inkubation bei 37°C 15 Minuten auf 100°C erhitzt worden waren, zeigten hinsichtlich der Zeitunabhängigkeit und des absoluten Anteils gleiches Verhalten. Der unspezifische Beitrag zur zeitabhängigen (^{14}C)5-HT-Totalaufnahme wird damit bestätigt.

2. Metabolisierung des aufgenommenen (^{14}C)5-HT

Synaptosomen wurden nach 3minütiger (^{14}C)5-HT-Inkubation extrahiert und dünnschichtchromatographisch untersucht: Proben, die mit Iproniazid behandelt worden waren, zeigten auf dem Chromatogramm nur einen Aktivitätspeak auf der Höhe von Serotonin, während die Kontrollproben ohne Iproniazid zwei Peaks entsprechend Serotonin und seines Metaboliten 5-Hydroxyindol-essigsäure aufwiesen.

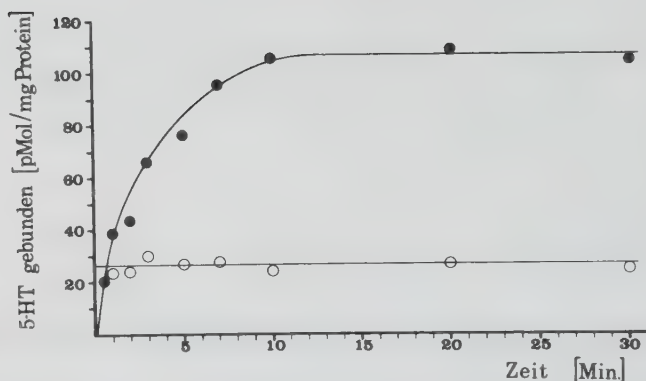


Abb. 2: Zeitabhängigkeit der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme in Synaptosomen. 1 ml einer Synaptosomensuspension wurde mit $5 \times 10^{-7}\text{M}$ (^{14}C) 5-HT bei 37°C bzw. 4°C (—○—○—) inkubiert. Die Aufnahme bei 37°C wurde durch Subtraktion des unspezifischen Anteils korrigiert. (—●—●—)

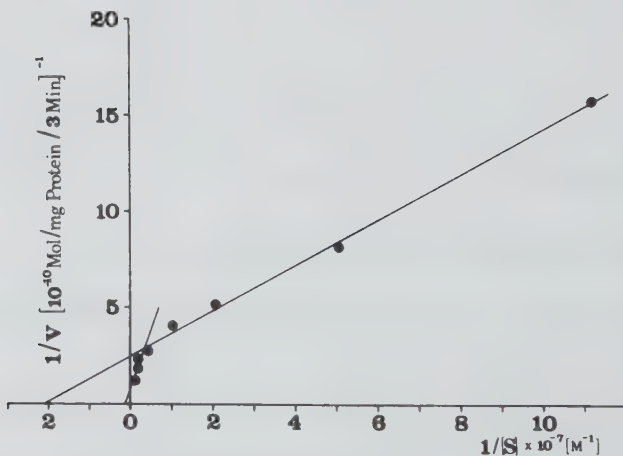


Abb. 3: Abhängigkeit der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme von der 5-HT-Konzentration. 1 ml einer Synaptosomensuspension wurde mit (^{14}C) 5-HT im Konzentrationsbereich von $1 \times 10^{-8}\text{M}$ bis $1 \times 10^{-6}\text{M}$ inkubiert. Die Werte entsprechen der spezifischen Aufnahme bei 37°C . $K_{d1} = 4.7 \times 10^{-8}\text{M}$, $K_{d2} = 6.6 \times 10^{-7}\text{M}$.

3. Kinetik der (^{14}C)5-HT-Aufnahme

Die Kinetik der (^{14}C)5-HT-Aufnahme wurde im Konzentrationsbereich von $1 \times 10^{-8}\text{M}$ bis $1 \times 10^{-6}\text{M}$ untersucht. Während der unspezifische, mit der Inkubation bei 4°C erfaßte Anteil der Gesamt-Aufnahme mit steigender (^{14}C)5-HT-Konzentration linear anstieg, näherte sich die durch Subtraktion dieses Betrages von der Totalaufnahme bei 37°C erhaltene spezifische Aufnahme etwa ab $2.5 \times 10^{-7}\text{M}$ einem Sättigungsplateau und stieg bei Konzentrationen über $7.5 \times 10^{-7}\text{M}$ nochmals an. Die Auftragung der Werte nach LINEWEAVER & BURK (1934) ergab eine in Richtung niedriger y- und x-Werte abknickende Kurve, die, als Überlagerung zweier Geraden unterschiedlicher Steigung, durch lineare Regressionsberechnung in zwei Geraden zerlegt wurde, wobei jeweils die Extrapolation auf $y = 0$ die Dissoziationskonstante ergab (Abb. 3). Der K_d -Wert der hohen Affinität betrug $4.7 \times 10^{-8}\text{M}$, derjenige der niedrigen $6.6 \times 10^{-7}\text{M}$. Die entsprechenden V_{max} -Werte lagen bei 1.33×10^{-11} bzw. 3.77×10^{-11} Mol/mg Protein/Minute.

4. Hemmung der (^{14}C)5-HT-Aufnahme

4.1 Hemmung der Serotoninaufnahme durch 1-Aminoadamantan

Da nach früheren Befunden sowohl 1-Aminoadamantan als auch D 145 in Konzentrationen über $2.5 \times 10^{-4}\text{M}$ eine Ausschüttung des in den Synaptosomen gespeicherten Serotonins bewirkt (WESEMANN & WILDENHAHN, 1975), wurde bei den nachfolgenden Untersuchungen zur Aufnahmehemmung die Konzentration 0.1 mM nicht überschritten. Die Ermittlung des Hemmtyps erfolgte nach den Methoden von LINEWEAVER & BURK (1934), DIXON (1953) und HUNTER & DOWNS (1945).

4.1.1 Hemmung durch 1-Aminoadamantan

Bei der K_I -Wert-Bestimmung mittels der Auftragung nach LINEWEAVER & BURK wurde für den Hemmansatz bei konstanter 1-Aminoadamantan-Konzentration ($5 \times 10^{-5} \text{M}$), die (^{14}C)5-HT-Konzentrationen im Bereich 10 bis 100 nM (hohe Affinität) bzw. von 0.25 bis $2.5 \mu\text{M}$ (niedrige Affinität) variiert. Die Steigungen der Geraden wurden aus der linearen Regression bestimmt und die K_I -Werte nach der Beziehung $K_I = i \cdot \left(\frac{v}{v_i} - 1\right)^{-1}$ errechnet. Der K_I -Wert des Bereiches der hohen Affinität ergab $5.7 \times 10^{-5} \text{M}$ (Abb. 4), derjenige der niedrigen Affinität $9.6 \times 10^{-5} \text{M}$ (Abb. 5).

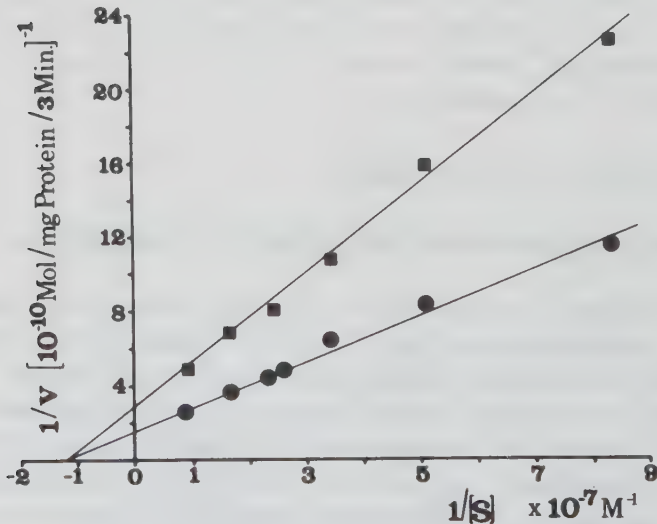


Abb. 4: Aufnahmehemmung von (^{14}C)5-HT (hoher Affinitätsbereich) mit 1-Aminoadamantan. Auftragung nach LINEWEAVER-BURK.

1 ml einer Synaptosomensuspension wurde mit 1-Aminoadamantan ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) 15 Minuten vorinkubiert und mit (^{14}C)5-HT im Konzentrationsbereich von $1 \times 10^{-8} \text{M}$ bis $1 \times 10^{-7} \text{M}$ weitere 3 Minuten inkubiert. ●●● Kontrolle, ■■■ Hemmung.

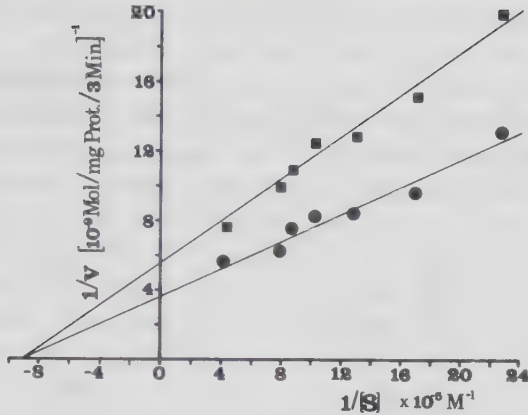


Abb. 5: Aufnahmehemmung von (^{14}C)5-HT (niedriger Affinitätsbereich) mit 1-Aminoadamantan. Auftragung nach LINEWEAVER-BURK.

1 ml einer Synaptosomensuspension wurde mit 1-Aminoadamantan ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) 15 Minuten vorinkubiert und mit (^{14}C)5-HT im Konzentrationsbereich von $2.5 \times 10^{-7}\text{M}$ bis $2.5 \times 10^{-6}\text{M}$ weitere 3 Minuten inkubiert. ●—● Kontrolle, ■—■ Hemmung.

Die Aufnahme-Hemmung beider Affinitäten entsprach dem nicht-kompetitiven Typ. Die Hemmung im Bereich der hohen Affinität wurde außerdem nach DIXON untersucht. Hierzu wurden Synaptosomen nach Vorinkubation mit verschiedenen 1-Aminoadamantan-Konzentrationen (10 bis $100 \mu\text{M}$) mit zwei (^{14}C)5-HT-Konzentrationen (50 und 100 nM) inkubiert. Die Regressionsanalyse ergab in der Auftragung $1/v$ gegen (I) zwei Geraden mit gemeinsamem Schnittpunkt, dem K_I -Wert, auf der Abszisse, d.h. wiederum eine nicht-kompetitive Hemmung; der K_I -Wert betrug $6.0 \times 10^{-5}\text{M}$ (Abb. 6). Eine zusätzliche Bestätigung brachte die Auftragung nach HUNTER & DOWNS. Der Ausdruck $i \cdot v_i (v - v_i)^{-1}$ wurde für jede 1-Aminoadamantan-Konzentration errechnet und gegen die eingesetzte (^{14}C)5-HT-Konzentration aufgetragen. Das Kriterium einer nicht-kompetitiven Hemmung (Steigung=0) wurde erfüllt. Der K_I -Wert, der dem Schnittpunkt der Geraden

mit der Ordinate entspricht, betrug $5.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Abb. 7). Aus den im LINEWEAVER-BURK-Diagramm abgelesenen V_{max} -Werten wurde die prozentuale Hemmung bei einer 1-Aminoadamantan-Konzentration von $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ bestimmt. Sie betrug für die (^{14}C)5-HT-Aufnahme im Bereich der hohen Affinität 43.4%, im Bereich der niedrigen Affinität dagegen 34.1%.

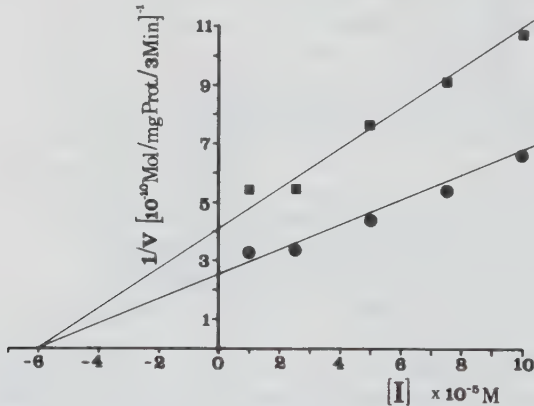


Abb. 6: Aufnahmehemmung von (^{14}C)5-HT (hoher Affinitätsbereich) mit 1-Aminoadamantan. Auftragung nach DIXON.

1 ml einer Synaptosomensuspension wurde mit 1-Aminoadamantan verschiedener Konzentrationen ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$ bis $1 \times 10^{-4} \text{ M}$) 15 Minuten vorinkubiert und weitere 3 Minuten mit (^{14}C)5-HT $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (●●●) und $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ (■ ■ ■) inkubiert.

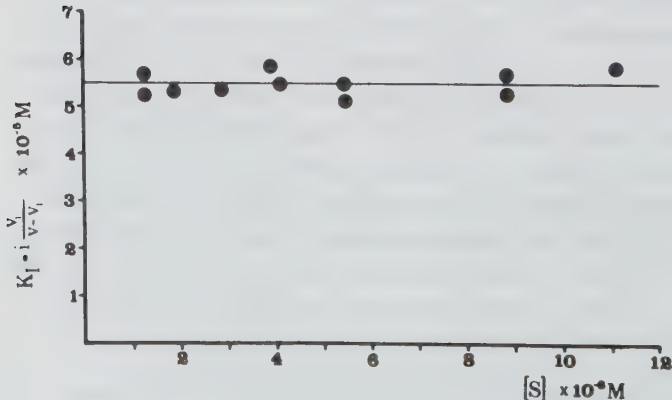


Abb. 7: HUNTER-DOWNS-Diagramm der (^{14}C)5-HT-Aufnahmehemmung (hoher Affinitätsbereich) durch 1-Aminoadamantan zur Ermittlung des Hemmtyps und des K_I -Wertes. Der K_I -Wert $5.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ lässt sich aus dem Schnittpunkt der Abszissenparallelen mit der Ordinate ablesen.

4.1.2 Hemmung durch 1-Amino-3.5-dimethyladamantan

Das Dimethylderivat des 1-Aminoadamantans, D 145, erwies sich als schwächerer Hemmstoff; der Hemmtyp war ebenfalls nicht-kompetitiv. Für die (^{14}C)5-HT-Aufnahme im hohen Affinitätsbereich wurden K_I -Werte von $9.7 \times 10^{-5}\text{M}$ nach LINEWEAVER-BURK (Abb. 8) und $7.6 \times 10^{-5}\text{M}$ nach DIXON (Abb. 9) gefunden. Die prozentuale Hemmbarkeit betrug 33.2%. Im Bereich der (^{14}C)5-HT-Aufnahme mit niedriger Affinität war der K_I -Wert, berechnet nach LINEWEAVER-BURK, $1.5 \times 10^{-4}\text{M}$ (Abb. 10) und die prozentuale Hemmung 24.8%.

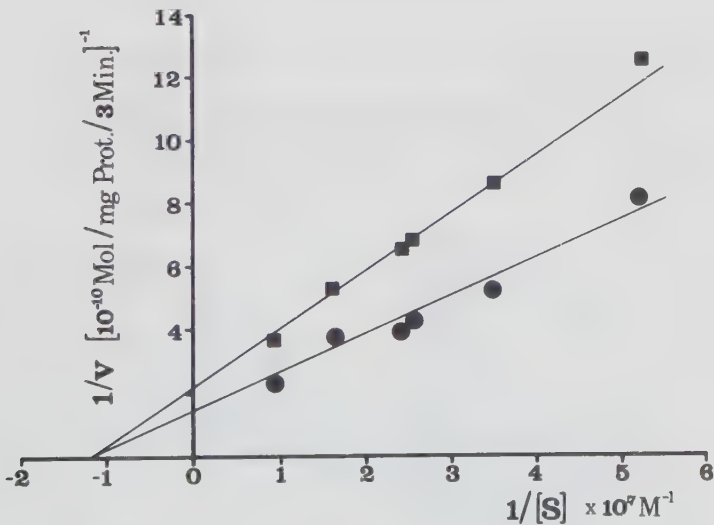


Abb. 8: Aufnahmehemmung von (^{14}C)5-HT (hoher Affinitätsbereich) mit D 145. Auftragung nach LINEWEAVER-BURK.

1 ml einer Synaptosomensuspension wurde mit D 145 ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) 15 Minuten vorinkubiert und weitere 3 Minuten mit (^{14}C)5-HT im Konzentrationsbereich von $1 \times 10^{-8}\text{M}$ bis $1 \times 10^{-7}\text{M}$ inkubiert.

●—● Kontrolle, ■—■ Hemmung.

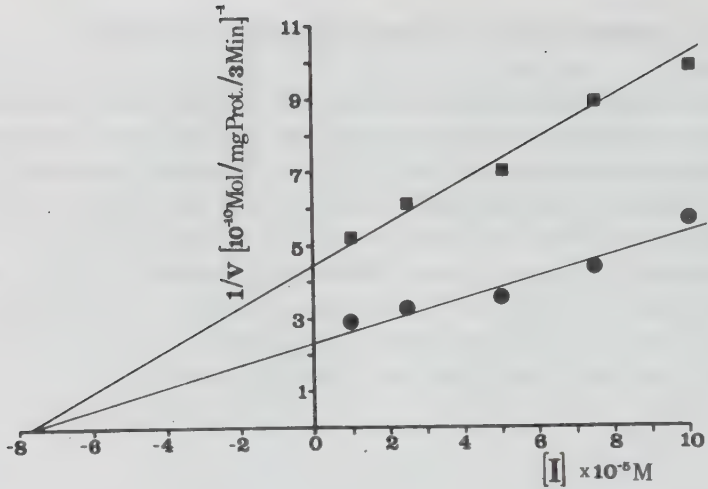


Abb. 9: Aufnahmehemmung von $(^{14}\text{C})5\text{-HT}$ (hoher Affinitätsbereich) mit D 145. Auftragung nach DIXON.

1 ml einer Synaptosomensuspension wurde nach 15minütiger Vorinkubation mit D 145 verschiedener Konzentrationen ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$ - $1 \times 10^{-4} \text{ M}$) weitere 3 Minuten mit $(^{14}\text{C})5\text{-HT}$ $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (●—●) und $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ (■—■) inkubiert.

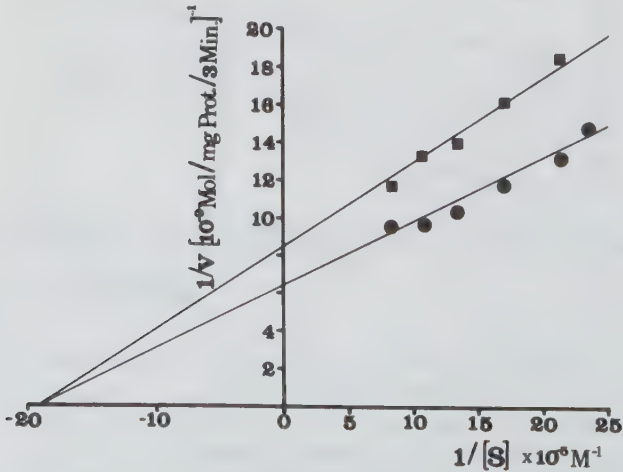


Abb. 10: Aufnahmehemmung von $(^{14}\text{C})5\text{-HT}$ (niedriger Affinitätsbereich) mit D 145. Auftragung nach LINEWEAVER-BURK.

1 ml Synaptosomensuspension wurde nach 15minütiger Vorinkubation mit D 145 ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) weitere 3 Minuten mit $(^{14}\text{C})5\text{-HT}$ -Konzentrationen von $2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ bis $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ inkubiert.

●—● Kontrolle, ■—■ Hemmung.

4.2 Aufnahmehemmung durch SH-Blocker

Zur Ermittlung der Abhängigkeit der (^{14}C)5-HT-Aufnahme von der Dauer der SH-Gruppen-Blockade wurden Synaptosomen 0, 15, 30 und 60 Minuten lang bei 0°C mit N-Äthylmaleinimid ($1 \times 10^{-4}\text{M}$ Endkonzentration) vorinkubiert. Es zeigte sich zunächst ein steiler Abfall der (^{14}C)5-HT-Aufnahme gefolgt von geringerer Abnahme bei Inkubationszeiten bis 60 Minuten (Abb. 11).

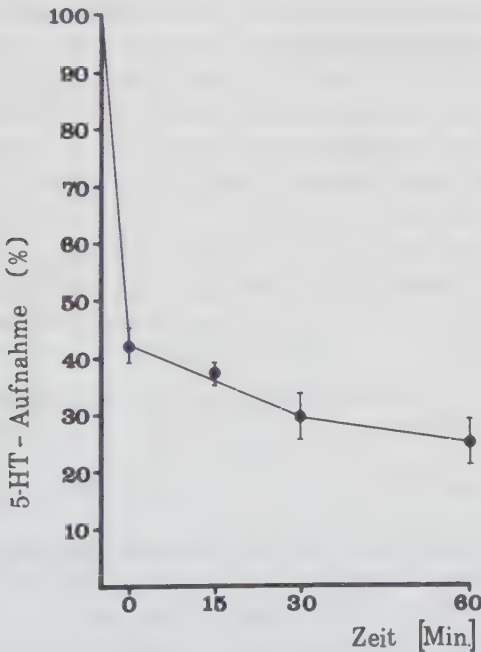


Abb. 11: Abhängigkeit der (^{14}C)5-HT-Aufnahmehemmung von der Vorinkubationszeit mit N-Äthylmaleinimid.

1 ml einer Synaptosomensuspension wurde mit 0.1 mM NEM von 0 bis 60 Minuten bei 0°C vorinkubiert, anschließend 10 Minuten auf 37°C temperiert und weitere 3 Minuten mit (^{14}C)5-HT ($1 \times 10^{-7}\text{M}$) inkubiert. Die Werte repräsentieren die spezifische 5-HT-Aufnahme als % der Kontrolle. Die Standardabweichung wurde aus jeweils 10 Bestimmungen errechnet.

Daraus ergab sich für alle folgenden Versuche mit SH-Blockern eine Vorinkubationszeit von 60 Minuten bei 0°C. Um das Hemmvermögen der Substanzen vergleichen zu können, wurde stets dieselbe Konzentration ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) eingesetzt. Bei Einsatz höherer Konzentrationen ist eine spontane Ausschüttung endogener Substanzen infolge induzierter Membrandefekte nicht auszuschließen.

Von den eingesetzten SH-Blockern war p-Chloromercuriphenylsulfonat-Natrium mit fast 100% Hemmung am wirksamsten (Tab.I). Ihm folgten Mersalyl mit 90%, N-Äthylmaleinimid 75%, Monojodacetat 60%, o-Jodosobenzoessäure 46,5% und Jodoacetamid 6,5%.

Tabelle I: Einfluß von SH-Reagenzien auf die 5-HT-Aufnahme in Synaptosomen.

Sulphydrylgruppen-Blocker 0.1 mM	5-HT-Aufnahme (%)
p-Chloromercuriphenylsulfonat-Natrium	0.25 ± 0.5
Mersalyl	10.02 ± 1.6
N-Äthylmaleinimid	24.87 ± 4.0
Monojodacetat	39.43 ± 7.0
o-Jodosobenzoessäure	53.54 ± 4.9
Jodoacetamid	93.50 ± 2.3

1 ml-Aliquots wurden mit der betreffenden Reagenzlösung (Endkonz.: 0.1 mM) 1 Stunde bei 0°C vorinkubiert, anschließend 10 Minuten auf 37°C temperiert und 3 Minuten mit (^{14}C) 5-HT (0.1 μM) inkubiert. Die Werte repräsentieren die 5-HT-Restaufnahme in % der Kontrolle nach Abzug der unspezifischen Bindung, gemessen bei 4°C. Die Standardabweichung wurde aus jeweils 10 Bestimmungen berechnet.

4.3 Einfluß von Hemmstoffen des Elektronentransports

Eingesetzt wurden NaCN, das den letzten Schritt in der Atmungskette, die Elektronenübertragung von Cytochrom aa₃ auf Sauerstoff verhindert und das aus Streptomyces-Arten gewonnene Antibiotikum Antimycin A, das den Elektronentransfer von Cytochrom b auf Cytochrom c blockiert. NaCN hatte bei einer Konzentration von $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ mit annähernd 20prozentiger Hemmung der (¹⁴C)5-HT-Aufnahme einen relativ geringen Einfluß. Bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ betrug die Hemmung 48% (Tab. II). Ein Na⁺-bedingter Einfluß auf die (¹⁴C)5-HT-Aufnahme wurde durch parallele Inkubation mit äquimolaren NaCl-Konzentrationen ausgeschlossen. Antimycin A (15 µg/ml) bewirkte eine Aufnahmehemmung von 52%.

Tabelle II: Einfluß von Hemmstoffen der Atmungskette auf die 5-HT-Aufnahme in Synaptosomen.

	Konzentration	5-HT-Aufnahme (%)
Natriumcyanid	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$	51.96 ± 2.8
Antimycin A	$3 \times 10^{-5} \text{ M}$	47.67 ± 3.2

1 ml-Aliquots wurden mit Hemmstofflösung 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit (¹⁴C)5-HT (0.1 µM) 3 Minuten inkubiert. Die Werte repräsentieren die 5-HT-Restaufnahme in % der Kontrolle nach Abzug der unspezifischen Bindung, gemessen bei 4°C. Die Standardabweichung wurde aus jeweils 10 Bestimmungen berechnet.

4.4 Beeinflussung der oxidativen Phosphorylierung

2.4-Dinitrophenol ist bekannt als Substanz, die die energiereichen Koppelungsfaktoren zwischen Atmungskette und Phosphorylierung hydrolysieren und damit zerstören (KARLSON, 1972), wobei die Atmung selbst erhalten bleibt. Ähnliche Wirkung hat das K^+ -abhängige Ionophor Valinomycin, das zusätzlich noch die Membranpermeabilität für K^+ erhöht. Die dritte eingesetzte Substanz, das Antibiotikum Oligomycin, greift durch Blockierung der Phosphorylierung von ADP zu ATP in die oxidative Phosphorylierung ein. 2.4-Dinitrophenol ($10^{-4}M$) hemmte die 5-HT-Aufnahme um 31% (Tab. III). Valinomycin (5 $\mu g/ml$) hemmte um 34%, Oligomycin (5 $\mu g/ml$) um 25% und in der Konzentration von 10 $\mu g/ml$ um 45%. Durch Kombination von Valinomycin (5 $\mu g/ml$) mit 2.4-Dinitrophenol ($10^{-4}M$) konnte die Wirkung verstärkt werden auf eine 85prozentige Aufnahmehemmung.

Tabelle III: Einfluß von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung auf die 5-HT-Aufnahme in Synaptosomen.

	Konzentration	5-HT-Aufnahme (%)
2.4-Dinitrophenol	$1 \times 10^{-4}M$	69.02 ± 4.3
Valinomycin	5 $\mu g/ml$	66.16 ± 5.2
2.4-Dinitrophenol + Valinomycin	$1 \times 10^{-4}M$ + 5 $\mu g/ml$	15.30 ± 2.2
Oligomycin	5 $\mu g/ml$	75.53 ± 6.1
	10 $\mu g/ml$	55.12 ± 4.4

Die Versuchsbedingungen und Berechnung der Werte entsprechen der Beschreibung in der Legende von Tab. II.

4.5 Beeinflussung durch Hemmstoffe der Glykolyse

Substanzen, die in die Glykolyse eingreifen, zeigten nur eine geringe Wirkung: 2-Deoxy-D-glucose 10^{-4} M und 5×10^{-4} M, ein Konkurrent der Glucose bei der Phosphorylierung durch die Hexokinase, hemmte die (14 C)5-HT-Aufnahme um 8% (Tab.IV). Arsenat-Ionen (eingesetzt als $\text{Na}_2\text{H AsO}_4$), ein Hemmstoff der Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, hemmte in der Konzentration von 10^{-4} M um 6% und bei Erhöhung auf 5×10^{-4} M um 8%.

Tabelle IV: Einfluß von Hemmstoffen der Glykolyse auf die 5-HT-Aufnahme in Synaptosomen.

	Konzentration (mM)	5-HT-Aufnahme (%)
2-Deoxy-D-glucose	0.1	93.99 $\pm$ 4.0
	0.5	93.04 $\pm$ 3.5
Arsenat-Ionen	0.1	93.82 $\pm$ 3.3
	0.5	91.78 $\pm$ 2.0
Natriumfluorid	0.5	89.04 $\pm$ 4.4
Monojodacetat	0.1	79.20 $\pm$ 7.6
Arsenat-Ionen + NaCN	0.1	55.60 $\pm$ 5.2
	+ 0.5	
2-Deoxy-D-glucose + NaCN	0.1	55.40 $\pm$ 6.8
	+ 0.5	
Natriumfluorid + NaCN	0.1	49.58 $\pm$ 2.8
	+ 0.5	

Die Versuchsbedingungen und Berechnung der Werte entsprechen der Beschreibung in der Legende von Tab. II.

Natriumfluorid beeinflusste die (^{14}C)5-HT-Aufnahme in ähnlicher Größenordnung; im Bereich von $5 \times 10^{-4}\text{M}$ hemmte es um 11%. Monojodacetat gilt, neben seiner allgemeinen Eigenschaft als SH-Blocker, auch als Hemmstoff der Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase und wurde bei diesen Versuchen ohne Vorinkubation 60 Minuten bei 0°C eingesetzt. Die gelöste Substanz wurde wie alle anderen Hemmstoffe nur 10 Minuten bei 37°C mit Synaptosomen vorinkubiert. Die Aufnahmehemmung betrug unter diesen Bedingungen 21%. Auch eine Kombination von Hemmstoffen der Glykolyse mit Hemmstoffen der Atmungskette bewirkte keine Potenzierung der Hemmung, wie sie bei Versuchen mit Thrombozyten beobachtet wurde (HAACKE & WESE-MANN, 1976). Simultane Inkubation mit 10^{-4}M Dinatriumhydrogenarsenat und $5 \times 10^{-4}\text{M}$ NaCN sowie 10^{-4}M 2-Deoxy-D-glucose und $5 \times 10^{-4}\text{M}$ NaCN bewirkten eine Hemmung von 44%; 10^{-4}M Natriumfluorid mit $5 \times 10^{-4}\text{M}$ NaCN hemmten um 50%. Der Einfluß der drei Kombinationen war ähnlich dem von NaCN (48%). Die Größenordnung der Aufnahmehemmung durch die Hemmstoffe des Energiestoffwechsels war im Gegensatz zu den SH-Gruppen blockierenden Substanzen unabhängig von verschiedenen Vorinkubationszeiten. Eine Ausnahme bildeten die Hemmstoffe der Atmung NaCN ($5 \times 10^{-4}\text{M}$) und Antimycin A ($15 \mu\text{g/ml}$), die nach zusätzlicher 60minütiger Vorinkubation bei 0°C die Aufnahme-Hemmung von 48% auf 63% bzw. von 52% auf 66% erhöhten.

4.6 Hemmung durch Ouabain

Durch Ouabain, einem Hemmstoff der ATPase wurde die 5-HT-Aufnahme sehr wirksam, um 77% gehemmt. Bei einer Konzentration von 10^{-4}M verblieb eine Rest-Aufnahme von $23.12 \pm 1.9\%$ Serotonin.

4.7 Hemmbarkeit der 5-HT-Aufnahme durch D-LSD

Die Beeinflussung der 5-HT-Aufnahme in Synaptosomen durch D-LSD war gering. 10^{-6}M D-LSD zeigte praktisch keine Wirkung (4% Hemmung) und erst bei $6.0 \times 10^{-5}\text{M}$ LSD wurde die 5-HT-Aufnahme um 50% vermindert, wie aus der Dosiswirkungskurve zu entnehmen ist (Abb. 12).

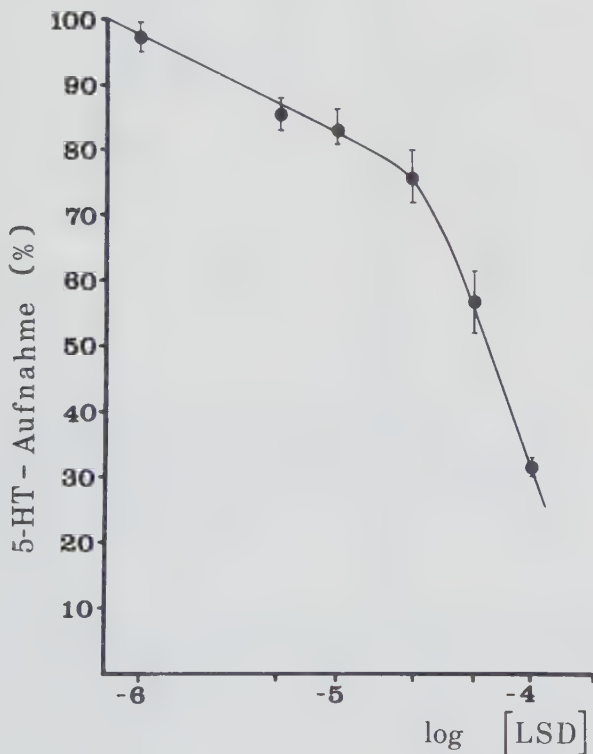


Abb. 12: Dosiswirkungskurve der (^{14}C)5-HT-Aufnahmehemmung mit D-LSD.

1 ml einer Synaptosomensuspension wurde simultan mit D-LSD im Konzentrationsbereich von 1 bis $100\text{ }\mu\text{M}$ und (^{14}C)5-HT ($1 \times 10^{-7}\text{M}$) 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Der IC_{50} -Wert, die D-LSD-Konzentration, die zu 50prozentiger Aufnahmehemmung führte, beträgt $6.0 \times 10^{-5}\text{M}$. Die Standardabweichung wurde jeweils aus 10 Bestimmungen errechnet.

In diesem Konzentrationsbereich entsprach die Hemmung durch LSD dem kompetitiven Typ (Abb. 13) mit einem K_I -Wert von $5.3 \times 10^{-5} \text{ M}$.

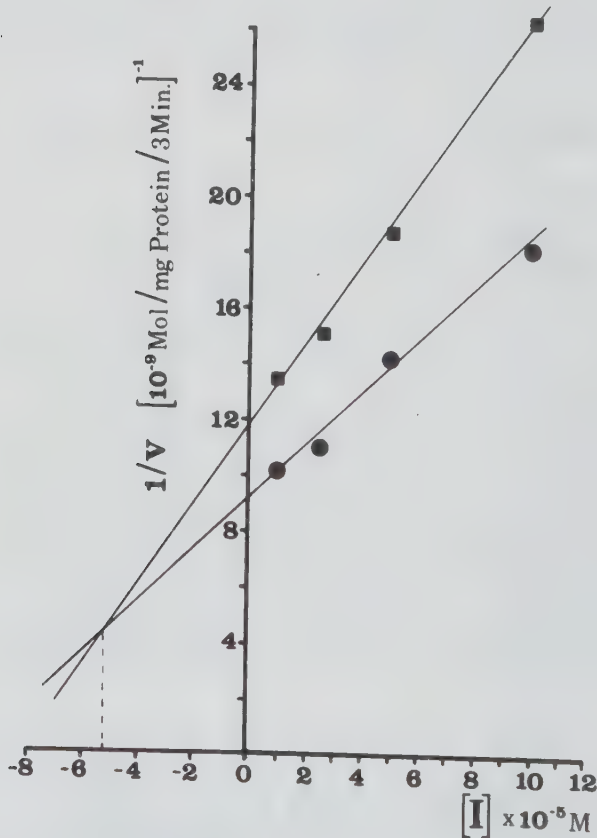


Abb. 13: $(^{14}\text{C})5\text{-HT}$ -Aufnahmehemmung (niedriger Affinitätsbereich) durch D-LSD. Auftragung nach DIXON.

1 ml einer Synaptosomensuspension wurde simultan mit D-LSD verschiedener Konzentrationen (10 bis 100 μM) und $(^{14}\text{C})5\text{-HT}$ $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ (●—●) und $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ (■—■) inkubiert. Der K_I -Wert, Schnittpunkt beider Geraden, liegt bei $5.3 \times 10^{-5} \text{ M}$.

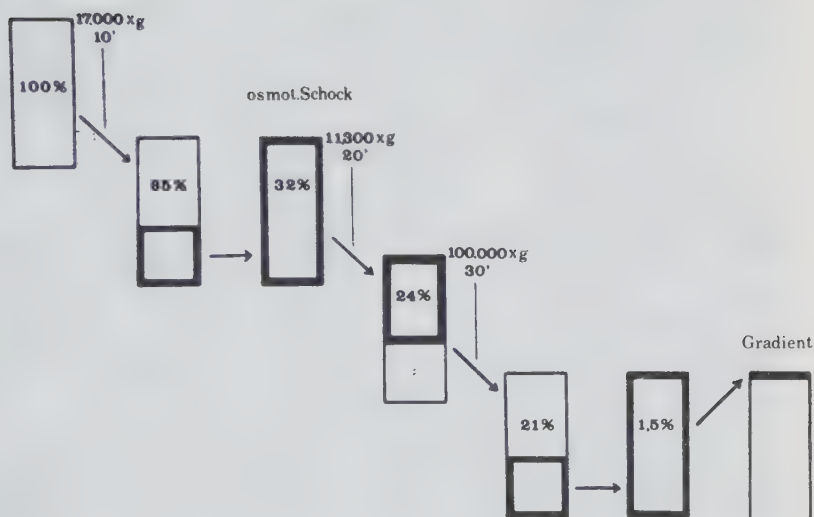


Abb. 14: Verteilung der Radioaktivität während der Präparation synaptischer Vesikel aus Synaptosomen nach Inkubation (30 Minuten) mit $10^{-6}M$ (^{14}C) 5-HT. Bei jedem Präparationsschritt wurde ein Aliquot entnommen zur Radioaktivitätsmessung; als Bezugspunkt wurde die Inkubationssuspension (Radioaktivität = 100%) gesetzt. Die umrandeten Felder bezeichnen die synaptische Vesikel enthaltende Fraktionen.

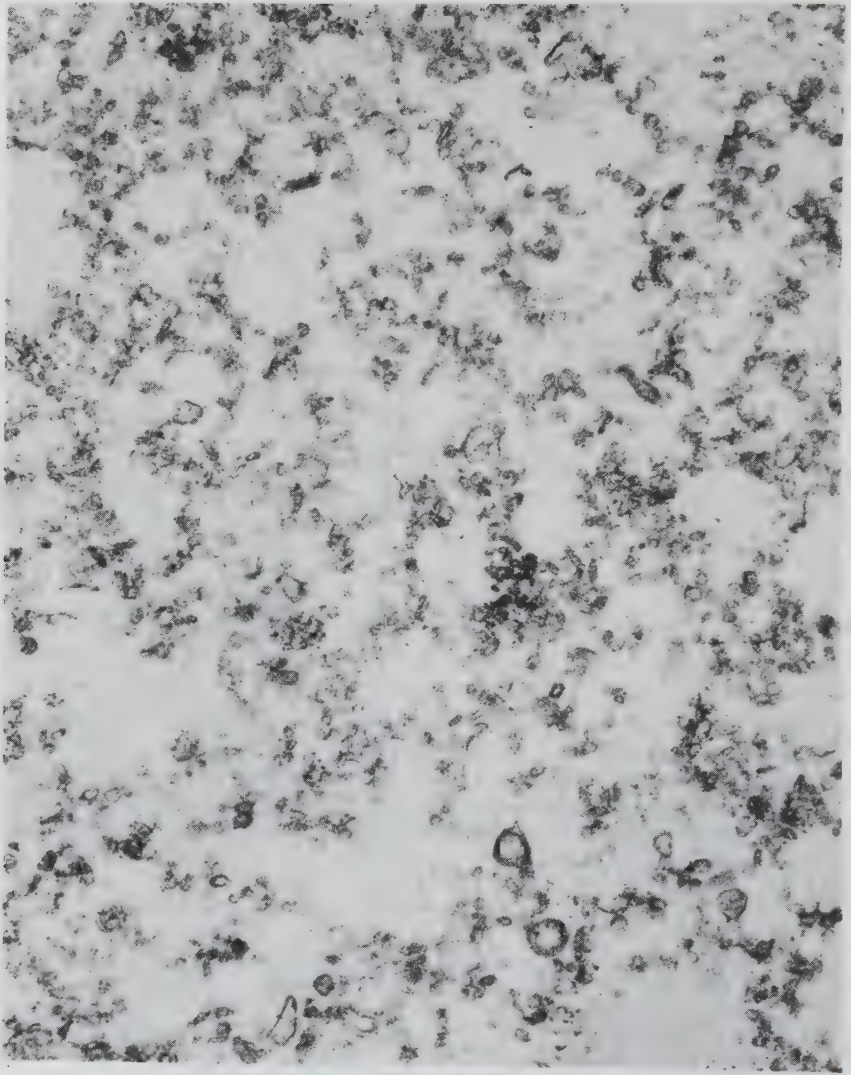


Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme synaptischer Vesikel:
Das Vesikelpellet wurde in gepufferter Glutaraldehydlösung (3%)
und in Osmiumtetroxid fixiert, in einer aufsteigenden Alkohol-
reihe entwässert und in Epon eingebettet. Vergrößerung: 1 : 54.000.

5. Verteilung des aufgenommenen (^{14}C)5-HT in Synaptosomen

Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung des inkorporierten markierten Serotonins in den Synaptosomen wurden zunächst aus den Nervenendigungen synaptische Vesikel isoliert und die Radioaktivität in den Fraktionen der einzelnen Isolierungsschritte, insbesondere des Cytoplasmas und der Speichergranula, gemessen.

5.1 Verteilung der Radioaktivität während der Isolierung synaptischer Vesikel.

Isolierte Synaptosomen wurden 30 Minuten in KREBS-Phosphat-Puffer mit (^{14}C)5-HT (Endkonzentration 10^{-6}M) inkubiert; die in der Inkubationssuspension gemessene Aktivität wurde als Bezugspunkt der Aktivitätsverteilung nach Fraktionierung gleich 100% gesetzt (Abb. 14). Die Sedimentierung der Suspension (17.000xg, 10 Minuten) ergab im Überstand eine verbleibende Aktivität von 65% der Gesamtaktivität, d.h. bei Vernachlässigung des im intersynaptosomalen Volumen eingeschlossenen, nicht aufgenommenen Serotonins betrug die Aufnahme rund 35%. Die nach Suspension des Synaptosomenpellets in Wasser (= osmotischer Schock) gemessene Aktivität lag bei 32%. Nach Abzentrifugieren (11.300 x g, 20 Minuten) der Synaptosomentrümmen und Mitochondrien verblieb im Überstand eine Restaktivität von 24%, die sich im partikelfreien Überstand (106.000 x g, 30 Minuten), dem Cytoplasma, auf 21% verminderte. Die Aktivität im Pellet, der "Rohen Vesikelfraktion" war sehr gering; nach Resuspendierung des Pellets in Wasser wurden noch 1.5% gemessen. Zum Vergleich wurde als Ausgangsmaterial statt der "Reinen Synaptosomen" die "Rohe Mitochondrienfraktion", bestehend aus Synaptosomen, Mitochondrien und Myelin, eingesetzt. Die Fraktion, die nicht einem Sucrose-Dichtegradienten ausgesetzt war, wurde ebenfalls mit (^{14}C)5-HT (Endkonzentration 10^{-6}M)

30 Minuten inkubiert und anschließend identischen Versuchsbedingungen unterworfen. Die Radioaktivitätsverteilung unterschied sich nicht merklich von der bei "Reinen Synaptosomen", nur das als "Rohe Vesikelfraktion" bezeichnete Pellet wies mit 0.6% der Ausgangsaktivität noch weniger Restaktivität auf.

5.2 Verteilung des (^{14}C)5-HT in der Vesikelfraktion

Die in Wasser suspendierte "Rohe Vesikelfraktion" wurde über einen Sucrose-Dichtegradienten ($54.800 \times g$, 2 Stunden) aufgetrennt und fraktioniert. Sowohl bei der Präparation aus "Reinen Synaptosomen" als auch aus der "Rohen Mitochondrienfraktion" entstand ein Proteinpeak, der auf eine Konzentrierung der Vesikel schließen lässt, was elektronenmikroskopisch bestätigt wurde (Abb. 15). Im Gegensatz zu dieser Vesikelanreicherung zeigte die Radioaktivität von der Oberfläche des Gradienten zum Boden hin das Bild einer kontinuierlichen Abnahme, die einer partikulären Bindung widerspricht. Zum Ausschluß einer Konzentrationsgradientenbedingung (^{14}C)5-HT-Abnahme in den Vesikeln wurde in Kontrollversuchen der osmotische Schock mit 5 mM TRIS-EDTA, pH 6.5 und Zusatz von $5 \times 10^{-7}\text{M}$ unmarkiertem Serotonin durchgeführt. Von einer Verminderung der Aktivität bei der rohen Vesikelfraktion abgesehen, blieb das Verteilungsprofil unverändert.

5.3 Bindung des (^{14}C)5-HT im Cytoplasma

Das 5-HT-Bindungsvermögen der synaptosomalen Cytoplasmafraktion wurde sowohl unmittelbar durch Inkubation derselben mit (^{14}C)5-HT gemessen, als auch nach Isolierung der Fraktion aus Synaptosomen, die zuvor mit (^{14}C)5-HT inkubiert worden waren.

5.3.1 (^{14}C)5-HT-Bindung nach Inkubation des Cytoplasmas

Der Isolierung der Cytoplasmafraktion ging zur Hemmung der Monoaminoxidase zunächst eine Inkubation der Synaptosomen mit Iproniazid (6 mM) voraus; der osmotische Schock wurde zur Eliminierung eventuell die Bindung störender Ca^{2+} -Ionen in TRIS-EDTA 5 mM, pH 6.5 durchgeführt. Die Inkubation der Cytoplasmafraktion erfolgte mit (^{14}C)5-HT $2 \times 10^{-7}\text{M}$, d.h. einer Konzentration, die derjenigen entsprach, die sich im Cytoplasma-Überstand nach vorheriger Inkubation der Synaptosomen mit (^{14}C)5-HT einstellte. Unter diesen Bedingungen konnte im Kohle-Assay keinerlei 5-HT-Bindung nachgewiesen werden. Wurde jedoch die Cytoplasmafraktion vor der Inkubation mit (^{14}C)5-HT über Nacht gegen 0.02 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7.4 dialysiert ($2 \times 3\text{ l}$, 4°C), so verblieben nach Abtrennung des freien 5-HT 1.8 pMol/mg Protein gebunden.

5.3.2 (^{14}C)5-HT-Bindung nach Inkubation der Synaptosomen

Diesem Befund in Absatz 5.3.1 entsprechend wurden Synaptosomen nach Vorinkubation mit (^{14}C)5-HT einem osmotischen Schock durch Einfrieren und Auftauen in 0.02 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.4 unterworfen. Vor Beginn des Kohle-Assays wurde die Totalaktivität in der Cytoplasmafraktion bestimmt; sie entsprach einer $1.98 \times 10^{-7}\text{M}$ 5-HT-Lösung. Die (^{14}C)5-HT-Bindung am Protein betrug 1.9 pMol/mg Protein.

D. DISKUSSION

Zahlreiche Arbeiten beschreiben Einzelaspekte der Serotoninaufnahme in Gehirngewebe, jedoch ist häufig, infolge unterschiedlicher Präparationen und Versuchsbedingungen, ein direkter Vergleich der Ergebnisse erschwert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Serotoninaufnahme in Synaptosomen hinsichtlich ihrer Kinetik, der Abhängigkeit von energetischen Voraussetzungen und freien SH-Gruppen sowie der Selektivität in Bezug auf D-LSD und der Einfluß des 1-Aminoadamantans und dessen 3.5-Dimethylderivates D 145 untersucht.

Die 5-HT-Aufnahme stellt einen temperatur- und konzentrationsabhängigen Prozeß dar. Bei 37°C erreichte die Aufnahme, ähnlich den Befunden von ROSS & RENYI (1967), innerhalb von 10 Minuten ein Sättigungsplateau, während die entsprechende Kurve bei 4°C sowie auch bei 100°C als Abszissenparallele keine Zeitabhängigkeit zeigte. Dieser Beitrag zur Gesamtaufnahme bei 37°C entspricht wahrscheinlich dem an die Synaptosomen extern unspezifisch gebundenen und im intersynaptosomalen Raum eingeschlossenen (¹⁴C)5-HT-Anteil. Für den in die Synaptosomen aufgenommenen Anteil ist bei 37°C eine Inkubationszeit von 3 Minuten ausreichend, etwa 35% des Serotonins zu 5-Hydroxyindolessigsäure zu metabolisieren. Die (¹⁴C)5-HT-Aufnahmerate in den ersten Minuten gleicht jedoch bei Blockade der Monoaminoxidase derjenigen ohne Hemmstoff (ROSS & RENYI, 1967).

Die Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der 5-HT-Aufnahme ist abhängig vom gewählten Konzentrationsbereich im Inkubationsmedium. Bei den ersten Aufnahmestudien (SCHANBERG, 1963; ROBINSON et al., 1965), in denen millimolare Konzentrationen eingesetzt worden waren, konnte nur eine lineare, dem Typ einer einfachen Diffusion entsprechende

Aufnahme gemessen werden, die den sättigungsfähigen, sogenannten spezifischen Aufnahmemechanismus überlagerte. Diese bei niedrigen 5-HT-Konzentrationen wirksame Aufnahme erfüllt die MICHAELIS-MENTEN-Kinetik für den Sonderfall zweier Affinitäten. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen K_d -Werte von $4.7 \times 10^{-8} M$ für die hohe Affinität und $6.6 \times 10^{-7} M$ für die niedrige Affinität liegen etwa eine Zehnerpotenz unter den von SHASKAN & SNYDER (1970) und MARCHBANKS (1966) für die Aufnahme in Gehirnschnitte bzw. "nerve endings" angegebenen Werte, stehen jedoch in guter Übereinstimmung mit den Befunden von TUOMISTO & TUOMISTO (1973) bzw. CIOFALO (1974), die für die hohe Affinität einen K_d -Wert von 7.6 bzw. $2.2 \times 10^{-8} M$ angaben. Die Deutung der zwei Aufnahmeaffinitäten ist unterschiedlich; die niedrige Affinität wurde mit 5-HT-Bindung an MAO (MARCHBANKS, 1966) bzw. unspezifischer 5-HT-Aufnahme in catecholaminerge Neuronen erklärt (SHASKAN & SNYDER, 1970). Da die Noradrenalin-Aufnahme in Striatum-Schnitte durch 5-HT kompetitiv mit einem K_I -Wert hemmbar ist, der laut SHASKAN & SNYDER dem K_d -Wert der niedrigen 5-HT-Aufnahmeaffinität entspricht und die Hemmung der 5-HT-Aufnahme dieser Affinität durch Noradrenalin den 20- bis 50fachen Wert der hohen Affinität erreicht, ist die Aufnahme mit hoher Affinität wahrscheinlich auf serotonerge Neuronen beschränkt. Untersuchungen zur subzellulären Verteilung exogenen und endogenen Serotonins (KUCHAR et al., 1971) sowie eine selektive 5-HT-Aufnahmehemmung hoher Affinität in Synaptosomen nach Zerstörung serotonerger Neurone in der Raphe-Region (KUCHAR et al., 1974) bestärken diese Annahme. Grundsätzlich ist der Befund einer Aufnahme mit zwei verschiedenen Affinitäten für das Nervengewebe kein Einzelfall, sondern bei zahlreichen potentiellen Transmittersubstanzen (GABA: IVERSEN & JOHNSTON, 1971, Cholin: HAGA & NODA, 1973 und CARROL & BUTERBAUGH, 1975; Glycin, Glutaminsäure, Asparaginsäure: LOGAN & SNYDER, 1972) nachgewiesen. Im Falle des Glycins wurde

die hohe Affinität nur im Rückenmark gefunden, wo dieser Aminosäure die Funktion eines inhibitorischen Transmitters zukommt, nicht jedoch im Cortex. Diese Ausführungen zur Bedeutung der hohen Affinität erklären die Tatsache, daß zur weiteren Charakterisierung des hochspezifischen, d.h. auf serotonerge Nervenendigungen beschränkten 5-HT-Aufnahme-Mechanismus ein Serotonin-Konzentrationsbereich ($= 5 \times K_d M$) gewählt wurde, in dem eine Überlagerung der Effekte durch Beiträge der niedrigen Affinität vernachlässigbar ist.

Die Abhängigkeit der spezifischen 5-HT-Aufnahme hoher Affinität vom Energiestoffwechsel der Synaptosomen wurde mit zahlreichen Hemmstoffen der Glykolyse, der Atmung, der oxidativen Phosphorylierung und allgemeiner Sulfhydrylgruppenblockade sowie spezifischer Hemmung der Na^+K^+ -aktivierbaren Membran-ATPase untersucht. Die Blockade der Glykolyse auf den Stufen der Hexokinase (2-Deoxy-D-glucose, 0.1 und 0.5 mM), der Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Na_2HAsO_4 , 0.1 mM, 0.5 mM; Monojodacetat 0.1 mM) und der Enolase (NaF 0.1 mM, 0.5 mM) zeigte insgesamt mit einer 5-HT-Aufnahmehemmung von etwa 10% den geringsten Effekt. Die durch Monojodacetat bewirkte Hemmung von 21% beruht wahrscheinlich überwiegend auf einer allgemeinen SH-Gruppen-Blockade (s. unten). Bei Einsatz von Hemmstoffen der Atmungskette (NaCN 0.5 mM; Antimycin A $3 \times 10^{-5} M$) verblieb eine Restaufnahme von etwa 50% der Kontrolle, die auch durch simultane Blockade der Glykolyse und Atmung nicht unterschritten wurde. Schließlich zeigte auch die Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung (2.4-DNP 0.1 mM; Oligomycin 1 bis $2 \times 10^{-5} M$; Valinomycin 5 μM) mit einer Hemmung im Bereich von 30 bis 45% nur einen begrenzten Einfluß auf die 5-HT-Aufnahme. Alle diese Eingriffe in den Energiestoffwechsel unter den gewählten experimentellen Bedingungen (3 Minuten Inkubation) lassen auf ei-

ne geringe Störanfälligkeit der 5-HT-Aufnahme hinsichtlich eines intrazellulären ATP-Abfalles vermuten, der z.B. in Gehirnschnitten nach längerer Inkubation (30 Minuten) mit NaCN 0.5 mM 90% und 2.4-DNP 0.1 mM 87% erreichte (BANAY-SCHWARTZ et al., 1974). Die Aminosäure-Aufnahme in Hirngewebe zeigte ähnliches Verhalten, denn neben hohen Aufnahme-Raten bei niedrigen ATP-Konzentrationen wurden niedrige bei hohem ATP beschrieben (BATTISTIN et al., 1969; BANAY-SCHWARTZ et al., 1971, 1974).

Als wesentlich wirksamere Hemmstoffe der 5-HT-Aufnahme im Vergleich der Glykolyse und Atmung, erwiesen sich das Strophanthus-Glycosid Ouabain und die Sulfhydrylgruppen-Blocker. Die Hemmung durch Ouabain (0.1 mM), ein Hemmstoff der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, betrug 77%. Auch die SH-Gruppen-Reagenzien wirken, neben einem Angriff an hypothetischen Carrier- bzw. Rezeptormolekülen, über diesen Mechanismus, d.h. eine Inaktivierung der ATPase, für deren Aktivität freie SH-Gruppen erforderlich sind. So konnte an Gehirnschnitten mit p-Chloromercuriphenylsulfonat-Na, das in der vorliegenden Arbeit die 5-HT-Aufnahme vollständig hemmte, eine Verdoppelung der Na^+ -Konzentration sowie ein 80prozentiger Abfall der K^+ -Konzentration im Gewebe gezeigt werden (BANAY-SCHWARTZ et al., 1971). Die große Streubreite in der Effektivität der SH-Blocker, z.B. von p-Chloromercuriphenylsulfonat-Na mit 0.25% bis Jodoacetamid mit 93.5% 5-HT-Restaufnahme gegenüber den Kontrollansätzen ist allgemein bekannt und Gegenstand zahlreicher Erklärungsversuche (WEBB, 1966).

Aus der deutlichen Abhängigkeit der 5-HT-Aufnahme von der Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in der Synaptosomenmembran lassen sich Rückschlüsse auf die Energetik des Aufnahmeproganges ziehen. Wie gezeigt wurde, ist die Aufnahme temperatur-, zeit- und nichtlinear konzentrationsabhängig sowie sättigungsfähig, womit die einfache Diffusion ausgeschlossen werden kann. Eine katalysierte Diffusion mit

limitiertem Carrier entspricht dagegen formal der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik. Wird dabei der transportierte Stoff konzentriert, d.h. erfolgt der Transport gegen einen Konzentrationsgradienten, wie im Falle des Serotonins wahrscheinlich, so muß die Aufnahme zumindest indirekt mit einer energieliefernden Reaktion verbunden sein, bei direkter, unmittelbar mit dem Aufnahme-prozeß verbundener Energiebereitstellung durch Hydrolyse energiereicher Verbindungen läge ein aktiver Transport vor. Ionenfluxmessungen ergaben, daß der Hemmung des 5-HT-Transportes durch ATPase-Blockade stets ein Zusammenbruch des Ionengradienten, d.h. ein Na^+ -Ein- und K^+ -Ausstrom vorausging (TISSARI et al., 1969, BANAY-SCHWARTZ, 1974). Nach diesem Befund liefert wahrscheinlich der von der Na^+ - K^+ -ATPase aufrechterhaltene Na^+ -Gradient die zur 5-HT-Akkumulierung notwendige Energie (TISSARI et al., 1969). Eine Erniedrigung des ATP-Spiegels durch entkoppelnde Substanzen oder Hemmstoffe der Atmung hat damit erst sekundär, nämlich nach Ausgleich des Na^+ -Gradienten, eine Verminderung bzw. einen Stillstand der 5-HT-Aufnahme zur Folge. Offenbar verblieb nach 3minütiger Inkubation mit NaCN, Oligomycin sowie Antimycin A, die je die 5-HT-Aufnahme um etwa 50% verminderten, eine für partiellen Betrieb der Na^+ - K^+ -ATPase ausreichende ATP-Konzentration.

Unabhängig von der treibenden Kraft der 5-HT-Aufnahme muß sowohl bei erleichterter Diffusion als auch bei aktivem Transport mit einer Konkurrenz ähnlicher Substrate am gleichen Carrier gerechnet werden. Das dem Serotonin strukturenaloge Indolderivat Lysergsäurediäthylamid (D-LSD) gilt nach WOOLLEY & SHAW (1954) aufgrund seiner halluzinogenen Wirkung als zentraler Antagonist des Serotonins. Da in späteren Studien im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Serotonin-Rezeptors gezeigt werden konnte, daß D-LSD an 5-HT- bindenden Membranproteinen als wirksamster

5-HT-Konkurrent mit zwei Affinitäten bindet ($K_{d1}=9 \times 10^{-9} \text{ M}$, $K_{d2}=1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$; FARROW & VAN VUNAKIS, 1973) wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch die 5-HT-Aufnahme in Synaptosomen durch D-LSD beeinflussbar ist. Der gefundene K_I - bzw. IC_{50} -Wert für die Hemmung der 5-HT-Aufnahme liegt mit $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (bzw. $6 \times 10^{-5} \text{ M}$) wesentlich unter den Werten, die in Bindungsstudien mit Hirnhomogenat und Membranfraktionen gefunden worden waren, steht aber in Einklang mit der von ROSS & RENYI (1967) berichteten 10prozentigen 5-HT-Aufnahmehemmung in Synaptosomen durch $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ D-LSD. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß LSD an verschiedenen Stellen innerhalb der Synapse offenbar mit unterschiedlicher Intensität wirkt und die haluzinogene Wirkung nicht mit einer Hemmung der 5-HT-Aufnahme in Beziehung steht. Denn während eine intravenöse Injektion von 7.5 µg/kg D-LSD ($= 2 \times 10^{-8} \text{ M}$) in Rattenhirn eine vollständige Hemmung serotonerger Neurone bewirkt (AGHAJANIAN et al., 1970), werden, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, in die Synaptosomenfraktion unter Einfluß von 10^{-6} M D-LSD noch fast 100% 5-HT aufgenommen. Außerdem soll die 5-HT-Aufnahmehemmung in Synaptosomen im Gegensatz zur D-LSD-spezifischen Bindung (BENNET & AGHAJANIAN, 1974) gleichermaßen durch D- und L-LSD möglich sein (MARCHBANKS, 1967 a).

Die Verteilung des in die Synaptosomen aufgenommenen Serotonins hinsichtlich der Kompartimente, insbesondere der Mechanismus der Aufnahme in die Vesikel, ist bisher unbekannt. Die vorliegenden Versuche zeigten, daß Nervenendigungen das aufgenommene (^{14}C) 5-HT während des osmotischen Schocks in Wasser fast vollständig abgeben; nur etwa 20% der ursprünglichen Gesamt-Radioaktivität fanden sich mit Synaptosomentrümmern und Mitochondrien im Präzipitat, während der größte Anteil im Überstand verblieb, der neben kleinen Membranfragmenten die sy-

naptischen Vesikel enthält. Im partikelfreien Überstand war die Aktivität nur unwesentlich niedriger. Die in der "Rohen Vesikelfraktion" gemessene Restaktivität von ca. 1% wurde im Gegensatz zum Protein während der Fraktionierung über einen Sucrosegradienten gleichmässig über den Gradienten verteilt; eine 5-HT-Anreicherung in Vesikeln war nicht nachweisbar. Synaptische Vesikel sind in hypoosmotischem Milieu hinsichtlich ihrer Morphologie stabil, geben aber einen Teil ihres gespeicherten Inhaltes ab, wie MARCHBANKS, 1968 am Beispiel ACh-haltiger Vesikel zeigen konnte. Da ein osmotischer Schock der Synaptosomen in 5 mM TRIS-EDTA, pH 6.5 ein Ausströmen des Vesikelinhaltes verhindern soll, wurde der Versuch unter etwas veränderten Bedingungen wiederholt. Zum osmotischen Schock der Synaptosomen wurde statt Wasser 5 mM TRIS-EDTA, pH 6.5 eingesetzt, ebenso wurde die "Rohe Vesikelfraktion" vor dem Auftragen auf den Gradienten statt in Wasser, in TRIS-EDTA, pH 6.5 suspendiert. ACh-haltige Vesikel sind zwar zur Speicherung von ACh gegen einen Konzentrationsgradienten fähig - der ACh-Gehalt in Vesikeln beträgt 0.15 M (WHITTAKER & SHERIDAN, 1965) und im Cytoplasma 0.4 mM (MARCHBANKS, 1968) - jedoch mußte im Falle der 5-HT-Vesikel als weitere Fehlerquelle zunächst eine mögliche (^{14}C)5-HT-Freisetzung aus den Vesikeln bis zum Konzentrationsausgleich ausgeschlossen werden. Auch nach Zusatz von 0.5 μM unmarkiertem 5-HT zur TRIS-EDTA-Lösung blieben die oben beschriebenen Ergebnisse unverändert, d.h. synaptische Vesikel aus Nervenendigungen, die mit (^{14}C)5-HT inkubiert worden waren, wiesen keine Anzeichen einer 5-HT-Aufnahme auf. Während in vivo eine radioaktive Markierung synaptischer Vesikel möglich ist, wie FARROW & O'BRIEN, 1971 durch intraventrikuläre Injektion von (^3H)-Acetat in Rattenhirn zeigen konnten, wird über die Fähigkeit isolierter Vesikel zur Aufnahme exogener Substanzen

diskutiert: Weder durch Inkubation von Synaptosomen mit (^{14}C)ACh, noch durch eine direkte Inkubation von synaptischen Vesikeln mit (^{14}C)ACh (MARCHBANKS, 1968) oder (^{35}S) Taurin (DE BELLEROCHÉ & BRADFORD, 1973) war eine radioaktive Markierung der Partikel möglich. Dennoch wird in verschiedenen Arbeiten über eine Aufnahme exogener Substanzen in synaptische Vesikel berichtet: KURIYAMA et al., 1968 und PHILIPPU & MATTHAEI, 1975 fanden eine Aufnahme von GABA und ACh bzw. 5-HT und Histamin. Auch WESEMANN, 1969 berichtet von einer (^{14}C)5-HT-Inkorporation in Vesikel. Laut KONTRO et al., 1976 soll das Verhalten synaptischer Vesikel gegenüber biogenen Aminen und Aminosäuren unterschiedlich sein: neben einer langsamen Aufnahme von Taurin und Glutaminsäure soll eine rasche Aufnahme von Noradrenalin und Dopamin stattfinden. Eine Voraussetzung für Aufnahmestudien in Vesikel ist eine reine Vesikelpräparation, die je nach angewandten Isolierungsverfahren sehr unterschiedlich erreicht wird; allzu leicht wird durch Bindung der Radioaktivität an Membranverunreinigungen eine Bindung bzw. Aufnahme in Vesikel vorgetäuscht. Andererseits können unterschiedliche Versuchsbedingungen -beispielsweise Inkubationszeiten und Puffermilieu- Grund abweichender Ergebnisse sein, so daß eine Entscheidung über das tatsächliche Verhalten synaptischer Vesikel gegenüber exogenen Substanzen noch aussteht.

Der größte Teil der von den Synaptosomen aufgenommenen Radioaktivität verblieb, wie bereits erwähnt, im partikel-freien Überstand, dem Cytoplasma. Diese Aktivität lag in den Versuchen, bei denen der osmotische Schock mit Wasser durchgeführt wurde, frei, d.h. ungebunden an Protein, vor. Eine Dissoziation eines ursprünglich vorhandenen (^{14}C)5-HT-Proteinkomplexes war jedoch in Anbetracht der Hypotonie des Mediums nicht auszuschließen, da eine Bindung molekularer Bestandteile im Cytoplasma von isotonischen Bedingungen ab-

hängen soll (WHITTAKER, 1973). Veränderte Versuchsbedingungen, u.a. Einführung von K^+ -Ionen, die in ähnlichen Problemstellungen eine optimale Speicherung bewirkten (BOGDANSKI, 1965), ergaben sowohl nach Inkubation des Cytoplasmas als auch intakter Synaptosomen mit (^{14}C)5-HT und nachfolgender Gewinnung des Cytoplasmas, eine Bindung von 1.9 pMol (^{14}C)5-HT/mg Protein. Dieser Wert entspricht etwa der Hälfte der von TAMIR et al. (1976) für ein sogenanntes lösliches Protein aus Rattenhirn angegebenen 5-HT-Bindungskapazität. Die Identität beider Proteinbindungen bleibt offen. Neben der von BARONDES, 1968 postulierten Funktion der löslichen Proteine als Carriermoleküle während des axoplasmatischen Transportes biogener Amine vom Perikaryon zur Nervenendigung wird auch die Funktion als Speichermöglichkeit für Amine diskutiert. Bei der Zerstörung von Synaptosomen durch osmotischen Schock fanden sich noch 50% des endogenen ACh in synaptischen Vesikeln gebunden, was zu einer Einteilung des ACh in eine "labile" und eine "stabile" Form führte (WHITTAKER et al., 1964); das "labile" ACh wurde im Cytoplasma gespeichert und bei osmotischem Schock freigegeben. Die biphasische Ausschüttung von 5-HT während elektrischer Reizung wurde ebenfalls mit der Existenz zweier Speicherformen -einer vesikulären und einer cytoplasmatischen- erklärt (SHIELDS & ECCLESTON, 1973).

Speicherung und Transport werden durch 1-Aminoadamantan unterschiedlich beeinflusst, das u.a. zur Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt wird. Diese Erkrankung ist infolge extrapyramidaler Neuronenuntergänge durch eine Dopamin- und Serotoninverarmung an den Rezeptoren gekennzeichnet. 1-Aminoadamantan, das im ZNS und peripher amphetaminähnlich wirkt, setzt aus catecholaminergen Neuronen Dopamin sowie Noradrenalin frei (STRÖMBERG et al., 1970) und erhöht, zu-

mindest in vitro, die Catecholamin-Synthese (SCATTON et al. 1970). Weiterhin wurde 1-Aminoadamantan neben seiner Eigenschaft als Inhibitor der Catecholamin-Aufnahme in Herz- und Gehirngewebe (VERNIER et al., 1969; FLETSCHER & REDFERN, 1970) zusammen mit seinem 3.5-Dimethylderivat D 145 als Hemmstoff der 5-HT-Bindung an synaptische Vesikel und Membranen beschrieben (WESEMANN & SCHOLLMAYER, 1973). Die Serotonin-Aufnahme wurde in der vorliegenden Arbeit an Synaptosomen durch 1-Aminoadamantan und sein Dimethylderivat D 145 nicht kompetitiv gehemmt. Die gefundenen K_I -Werte $5.7 \times 10^{-5} \text{ M}$ (1-Aminoadamantan) bzw. $9 \times 10^{-5} \text{ M}$ (D 145) sind mit Ergebnissen aus Untersuchungen an Thrombocyten vergleichbar (LEMMER, 1973; HAACKE & WESEMANN, 1976). Der Bereich der zur Aufnahme-Hemmung eingesetzten Adamantanamin-Konzentration war auf Werte unter 10^{-4} M beschränkt, da bei höheren Konzentrationen eine 5-HT-Ausschüttung beobachtet wurde (WESEMANN & WILDENHAHN, 1975); der Mechanismus dieser Reaktion ist unbekannt.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Serotoninaufnahme in isolierte Nervenendigungen, sowie die Hemmbarkeit dieser Aufnahme und die Verteilung des aufgenommenen Serotonins in Kompartimente studiert.

Die 5-HT-Aufnahme ist ein temperatur- und zeitabhängiger Prozeß: bei 37°C erfolgte die Aufnahme in der ersten Minute sehr rasch und erreichte nach 10 Minuten ein Sättigungsplateau, während der unspezifische Anteil, gemessen bei 4°C, sich als zeitunabhängig erwies. 5-HT wurde konzentrationsabhängig und sättigungsfähig über zwei verschiedene Mechanismen aufgenommen: mit hoher Affinität ($K_{d1} = 4.7 \times 10^{-8} \text{M}$) vermutlich spezifisch in serotonerge Nervenendigungen und mit niedriger Affinität ($K_{d2} = 6.6 \times 10^{-7} \text{M}$) wahrscheinlich in catecholaminerge Neuronen. Zur Bestimmung der Abhängigkeit der 5-HT-Aufnahme vom Energiestoffwechsel wurden Hemmstoffe der Glykolyse, der Atmung und der oxidativen Phosphorylierung eingesetzt, die jedoch nur einen begrenzten Effekt zeigten mit einer maximalen Hemmung von 50%. Demgegenüber konnte die 5-HT-Aufnahme durch Blockade der $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-ATPase}$ mit Ouabain zu 77% bzw. mit p-Chloromercuriphenylsulfonat-Natrium zu 100% gehemmt werden. 1-Aminoadamantan und sein 3.5-Dimethylderivat D 145 hemmten die (^{14}C) 5-HT-Aufnahme nicht-kompetitiv mit K_I -Werten von $5 \times 10^{-5} \text{M}$ bzw. $9 \times 10^{-5} \text{M}$. D-LSD, das als wirksamster Konkurrent an 5-HT-Bindungsstellen serotonerger Neurone gilt, zeigte nur schwachen Einfluß auf die 5-HT-Aufnahme ($\text{IC}_{50} = 5 \times 10^{-5} \text{M}$). Nach Inkubation der Synaptosomen mit (^{14}C) 5-HT fand sich der größte Teil der Radioaktivität im Cytoplasma, während in der Fraktion der synaptischen Vesikel keine 5-HT-Aufnahme nachweisbar war. In isotonischem Milieu konnte im Cytoplasma eine 5-HT-Bindung an Protein von 1.9 pMol/mg Protein nachgewiesen werden.

F. LITERATUR

AGHAJANIAN, G.K., FOOTE, W.E., SHEARD, M.H.: Action of psychogenic drugs on single midbrain raphe neurons.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 171: 178-187 (1970)

AKERT, K.: Struktur und Ultrastruktur von Nervenzellen und Synapsen.

Klin. Wschr. 49: 509-519 (1971)

AUERBACH, L.: Nervenendigungen in den Centralorganen.

Neurol. Zbl. 17: 445 (1897)

BANAY-SCHWARTZ, M., PIRO, L., LAJTHA, A.: Relationship of ATP levels to amino acid transport in slices of mouse brain.

Arch. Biochem. Biophys. 145: 199-210 (1971)

BANAY-SCHWARTZ, M., TELLER, D.N., GERGELY, A., LAJTHA, A.: The effects of metabolic inhibitors on amino acid uptake and the level of ATP, Na⁺ and K⁺ in incubated slices of mouse brain.

Brain Res. 71: 117-131 (1974)

BARONDES, S.H.: Further studies of the transport of protein to nerve endings.

J. Neurochem. 15: 343-350 (1968)

BATTISTIN, L., GRYNBAUM, A., LAJTHA, A.: Energy dependence of amino acid uptake in brain slices.

Brain Res. 16: 187-197 (1969)

BENNETT, J.L., AGHAJANIAN, G.K.: D-LSD binding to brain homogenates: possible relationship to serotonin receptors.

Life Sci. 15: 1935-1944 (1974)

BLACKBURN, K.J., FRENCH, P.C., MERRILLS, R.J.: 5-Hydroxytryptamine uptake by rat brain in vitro.

Life Sci. 6: 1653-1663 (1967)

BLAUSTEIN, M.P., JOHNSON JR., E.M., NEEDLEMAN, P.: Calcium-dependent norepinephrine release from presynaptic nerve endings in vitro.

Proc. Nat. Acad. Sci. 69: 2237-2240 (1972)

BOGDANSKI, D.F., PLETSCHER, A., BRODIE, B.B., UDENFRIEND, S.: Identification and assay of serotonin in brain.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 117: 82-88 (1956)

BOGDANSKI, D.F., BONOMI, L., BRODIE, B.B.: Occurrence of serotonin and catecholamines in brain and peripheral organs of various vertebrate classes.

Life Sci. 1: 80-84 (1963)

BOGDANSKI, D.F.: The effects of inorganic ions on the efflux of H^3 -NE from rat heart slices.
Pharmacologist 7: 168 (1965)

BRADFORD, H.F.: Respiration in vitro of synaptosomes from mammalian cerebral cortex.
J. Neurochem. 16: 675-684 (1969)

BRADFORD, H.F.: Cerebral cortex slices and synaptosomes: in vitro approaches to brain metabolism.
In FRIED., R. (Editor): Methods of Neurochemistry Vol. 3, p. 155 ff (New York: Marcel Dekker, 1972)

BRAY, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Analyt. Biochem. 1: 279-285 (1960)

CARROLL, P.T., BUTERBAUGH, G.G.: Regional differences in high affinity choline transport velocity in guinea-pig brain.
J. Neurochem. 24: 229-232 (1975)

CIOFALO, F.R.: Methadone inhibition of 3H -5-hydroxytryptamine uptake by synaptosomes.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 189: 83-89 (1974)

CUPELLO, A., HYDÉN, H.: Fractionation of RNA from brain synaptosomes and cytoplasmic subcellular fractions.
J. Neurochem. 25: 399-406 (1975)

DAHLSTRÖM, A., FUXE, K.: Evidence for the existence of monoamine-containing neurones in the central nervous system.
Acta physiol. scand. 62: Suppl. 232, 1 (1964)

DAHLSTRÖM, A., HÄGGENDAL, J.: Studies on the transport and life-span of amine storage granules in a peripheral adrenergic neuron system.
Acta physiol. scand. 67: 278-288 (1966)

DE BELLEROCHE, J.S., BRADFORD, H.F.: Amino acids in synaptic vesicles from mammalian cerebral cortex: a reappraisal.
J. Neurochem. 21: 441-451 (1973)

DEGUCHI, T., BARCHAS, J.: Regional distribution and developmental change of tryptophan hydroxylase activity in rat brain.
J. Neurochem. 19: 927-929 (1972)

DE ROBERTIS, E.: Adrenergic endings and vesicles isolated from brain.
Pharmacol. Rev. 18: 413-424 (1966)

DE ROBERTIS, E., RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, G.: Structural components of the synaptic region.

In: LAJTHA, A. (Ed.): Handbook of Neurochemistry Vol. 2, p. 327 ff (New York: Plenum Press, 1969)

DETTE, G.A., WESEMANN, W.: Studies on serotonin binding proteins of nerve ending membranes.

J. Neural Transmission 37: 281 - 295 (1975)

DIXON, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55: 170 (1953)

ESCUETA, A.V., APPEL, S.H.: Biochemical studies of synapses in vitro: II. potassium transport.

Biochemistry 8: 725-733 (1969)

FARROW, J.T., O'BRIEN, R.D.: Metabolites of ^3H -acetate bound to synaptic vesicles isolated from rat cerebral cortex.

J. Neurochem. 18: 963-973 (1971)

FARROW, J.T., VAN VUNAKIS, H.: Characteristics of d-lysergic acid diethylamide binding to subcellular fractions derived from rat brain.

Biochem. Pharmacol. 22: 1103-1113 (1973)

FLETSCHER, E.A., REDFERN, P.H.: The effect of amantadine on the uptake of dopamine and noradrenaline by brain homogenates.

J. Pharm. Pharmac. 22: 957-958 (1970)

FONNUM, F.: The compartmentation of choline acetyltransferase within the synaptosome.

Biochem. J. 103: 262-270 (1967)

FONNUM, F.: The distribution of glutamate decarboxylase and aspartate transaminase in subcellular fractions of rat and guinea-pig brain.

Biochem. J. 106: 401-412 (1968)

GERMAIN, M., PROULX, P.: Adenosinetriphosphatase activity in synaptic vesicles of rat brain.

Biochem. Pharmacol. 14: 1815-1819 (1965)

GRAY, G., WHITTAKER, V.P.: The isolation of nerve-endings from brain: an electron microscopic study of cell fragments derived by homogenisation and centrifugation.

J. Anat. 96: 79-88 (1962)

HAACKE, U., WESEMANN, W.: Induction of the platelet release reaction by 1.3-dimethyl-5-aminoadamantan, a new adamantan derivative.

Thromb. Diath. Haemorrh., 1976 (im Druck)

- HAGA, T., NODA, H.: Choline uptake systems of rat brain synaptosomes.
Biochim. Biophys. Acta 291: 564-575 (1973)
- HEBB, C.O., WHITTAKER, V.P.: Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase.
J. Physiol. 142: 187-196 (1958)
- HELD, H.: Beiträge zur Struktur der Nervenzellen und ihrer Fortsätze (2. Abhandlung).
Arch. Anat. Physiol. (Lpz.) 21: 204-294 (1897)
- HEYNS, W., VAN BAELEN, H., DE MOOR, P.: Study of steroid-protein binding by means of competitive adsorption: application to cortisol binding in plasma.
Clin. Chim. Acta 18: 361-370 (1967)
- HUNTER, A., DOWNS, C.: The inhibition of arginase by amino acids.
J. Biol. Chem. 157: 427-446 (1945)
- IVERSEN, L.L., JOHNSTON, G.A.R.: GABA uptake in rat c.n.s.: comparison of uptake in slices and homogenates and the effects of some inhibitors.
J. Neurochem. 18: 1939-1950 (1971)
- IVERSEN, L.L.: Uptake mechanisms for neurotransmitter amines.
Biochem. Pharmacol. 23: 1927-1935 (1974)
- JOHNSON, M.K., WHITTAKER, V.P.: Lactate dehydrogenase as a cytoplasmic marker in brain.
Biochem. J. 88: 404-409 (1963)
- JØRGENSEN, O.S., MELLERUP, E.T.: Endocytotic formation of rat brain synaptic vesicles.
Nature 249: 770-771 (1974)
- KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie 8. Aufl. S. 184 (1972)
- KATZ, B.: Nerv, Muskel und Synapse (G. Thieme-Verlag, Stuttgart 1971)
- KONTRO, P., PITKÄNEN, R.J., OJA, S.S.: Uptake of neurotransmitters by cerebral synaptic vesicles.
10th International Congress of Biochemistry, 1976, Abstr. Nr. 12-7-029
- KORENMAN, S.G.: Radio-ligand binding assay of specific estrogens using a soluble uterine macromolecule.
J. clin. Endocrinol. 28: 127-130 (1968)

- KUHAR, M.J., SHASKAN, E.G., SNYDER, S.H.: The subcellular distribution of endogenous and exogenous serotonin in brain tissue: comparison of synaptosomes storing serotonin, nor-epinephrine and GABA.
J. Neurochem. 18: 333-343 (1971)
- KUHAR, M.J., ROTH, R.H., AGHAJANIAN, G.K.: Synaptosomes from forebrain of rats with midbrain raphe lesions: selective reduction of serotonin uptake.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 181: 36-45 (1972)
- KUHAR, M.J., AGHAJANIAN, G.K., ROTH, R.H.: Serotonin neurons: a synaptic mechanism for the reuptake of serotonin.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 10: 287-295 (1974)
- KURIYAMA, K., ROBERTS, E., KAKEFUDA, T.: Association of the -aminobutyric acid system with a synaptic vesicle fraction from mouse brain.
Brain Res. 8: 132-152 (1968)
- LAGERCRANTZ, H., FRIED, G., DAHLIN, J.: An attempt to estimate the in vivo concentrations of noradrenaline and ATP in sympathetic large dense core nerve vesicles.
Acta physiol. scand. 94: 136-138 (1975)
- LEMMER, B.: Effects of amantadine and amphetamine on serotonin uptake and release by human blood platelets.
Europ. J. Pharmacology 21: 183-188 (1973)
- LINEWEAVER, H., BURK, D.: The determination of enzyme dissociation constants.
J. Am. Chem. Soc. 56: 658-666 (1934)
- LING, C.-M., ABDEL-LATIF, A.A.: Studies on sodium transport in rat brain nerve-ending particles.
J. Neurochem. 15: 721-729 (1968)
- LOGAN, W.J., SNYDER, S.H.: High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues.
Brain Res. 42: 413-431 (1972)
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
- MAICKEL, R.P., COX JR., R.H., SAILLANT, J., MILLER, F.P.: A method for the determination of serotonin and norepinephrine in discrete areas of rat brain.
Int. J. Neuropharmacol. 7: 275-281 (1968)

MANDELL, A.J., KNAPP, S., HSU, L.L.: Some factors in the regulation of central serotonergic synapses.
Life Sci. 14: 1-17 (1974)

MARCHBANKS, R.M.: Serotonin binding to nerve ending particles and other preparations from rat brain.
J. Neurochem. 13: 1481-1493 (1966)

MARCHBANKS, R.M.: The osmotically sensitive potassium and sodium compartments of synaptosomes.
Biochem. J. 104: 148-157 (1967)

MARCHBANKS, R.M.: Inhibitory effect of lysergic acid derivatives and reserpine on 5-HT binding to nerve ending particles.
Biochem. Pharmacol. 16: 1971-1979 (1967a)

MARCHBANKS, R.M.: Exchangeability of radioactive acetylcholine with the bound acetylcholine of synaptosomes and synaptic vesicles.
Biochem. J. 106: 87-95 (1968)

MAYNERT, E.W., LEVI, R., DE LORENZO, A.J.D.: The presence of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in vesicles from disrupted nerve-ending particles.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 144: 385-392 (1964)

MORGAN, J.G., AUSTIN, L.: Synaptosomal protein synthesis in a cell-free system.
J. Neurochem. 15: 41-51 (1968)

PHILIPPU, A., MATTHAEI, H.: Uptake of serotonin, gamma-aminobutyric acid and histamine into synaptic vesicles of the pig caudate nucleus.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287: 191-204 (1975)

RAMÓN Y CAJAL, S. (1890): zitiert nach: CLARA, M.: Das Nervensystem des Menschen. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. 3. neubearb. Aufl. S. 25 (Leipzig 1959)

RAPPORT, M.M.: Serum vasoconstrictor (serotonin). V. The presence of creatinine in the complex: a proposed study of the vasoconstrictor principle.
J. Biol. Chem. 180: 961-969 (1948)

ROBINSON, J.D., ANDERSON, J.H., GREEN, J.P.: The uptake of 5-hydroxytryptamine and histamine by particulate fractions of brain.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 147: 236-243 (1965)

RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, G., DE ROBERTIS, E.: 5-Hydroxytryptophan decarboxylase activity in nerve endings of the rat brain.
J. Neurochem. 11: 213-219 (1964)

ROSS, S.B., RENYI, A.L.: Accumulation of tritiated 5-hydroxytryptamine in brain slices.
Life Sci. 6: 1407-1415 (1967)

ROSS, S.B., RENYI, A.L.: Inhibition of the uptake of tritiated 5-hydroxytryptamine in brain tissue.
Europ. J. Pharmacol. 7: 270-277 (1969)

SAAVEDRA, J.M., BROWNSTEIN, M., AXELROD, J.: A specific and sensitive enzymatic-isotopic microassay for serotonin in tissues.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 186: 508-515 (1973)

SCATTON, B. CHERAMY, A. BESSON, M.J., GLOWINSKI, J.: Increased synthesis and release of dopamine in the striatum of the rat after amantadine treatment.
Europ. J. Pharmacol. 13: 131-133 (1970)

SCHADÉ, J.P., FORD, D.H.: Synaptic vesicles and the release of transmitter substance.
In: Basic Neurology, p. 206-210 (Elsevier Amsterdam, London, New York 1965)

SCHANBERG, S.M.: A study of the transport of 5-hydroxytryptophan and 5-hydroxytryptamine (serotonin) into brain.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 139: 191-200 (1963)

SHASKAN, E.G., SNYDER, S.H.: Kinetics of serotonin accumulation into slices from rat brain: relationship to catecholamine uptake.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 175: 404-418 (1970)

SHERRINGTON, C.S. (1897): zitiert nach: CLARA, M.: Das Nervensystem des Menschen. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. 3. neubearb. Aufl. S. 27 (Leipzig 1959)

SHIELDS, P.J., ECCLESTON, D.: Evidence for the synthesis and storage of 5-hydroxytryptamine in two separate pools in the brain.
J. Neurochem. 20: 881-888 (1973)

STRÖMBERG, U., SVENSSON, T.H., WALDECK, B.: On the mode of action of amantadine.
J. Pharm. Pharmac. 22: 959-961 (1970)

TAMIR, H., HUANG, Y.L.: Binding of serotonin to soluble protein from synaptosomes.
Life Sci. 14: 83-93 (1974)

TAMIR, H., KLEIN, A., RAPPORT, M.M.: Serotonin binding protein: enhancement of binding by Fe^{2+} and inhibition of binding by drugs.
J. Neurochem. 26: 871-878 (1976)

TISSARI, A.H., SCHÖNHÖFER, P.S., BOGDANSKI, D.F., BRODIE, B.B. Mechanism of biogenic amine transport: relationship between sodium and the mechanism of ouabain blockade of the accumulation of serotonin and norepinephrine by synaptosomes. *Mol. Pharmacol.* 5: 593-604 (1969)

TUOMISTO, L., TUOMISTO, J.: Inhibition of monoamine uptake in synaptosomes by tetrahydroharmane and tetrahydroisoquinoline compounds. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 279: 371-380 (1973)

TURNER, P.T., HARRIS, A.B.: Ultrastructure of synaptic vesicle formation in cerebral cortex. *Nature* 242: 57-58 (1973)

UCHIZONO, K.: Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature* 207: 642-643 (1965)

VERNIER, V.G., HARMON, J.B., STUMP, J.M., LYNES, T.E. MARVEL, J.P., SMITH, D.H.: The toxicologic and pharmacologic properties of amantadine hydrochloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15: 642-665 (1969)

WEBB, J.L.: Enzyme and metabolic inhibitors. Vol. II p. 635-653 (Academic Press, New York, London 1966)

WELSH, J.H., MOORHEAD, M.J.: The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates, especially in their nervous systems. *J. Neurochem.* 6: 146-169 (1960)

WESEMANN, W.: Isolation of 5-hydroxytryptamine containing vesicles and of synaptic membranes from rat brain. *FEBS-Letters* 3: 80-84 (1969)

WESEMANN, W., SCHOLLMEYER, J.D.: Biochemical effects of adamantanamines, a new class of drugs with antiparkinson activity. *Agents and Actions* 3: 195 (1973)

WESEMANN, W.: Biochemistry of serotonin and synaptic membranes in neurotransmission. In: JAENICKE, L. (Ed.): Biochemistry of sensory functions. pp. 565-591 (Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1974)

WESEMANN, W., WILDENHAHN, G.: Electrical and drug induced release of 5-HT from isolated nerve endings.

5th Internat. Meeting of the I.S.N (1975) Abstr. Nr. 39

WHITTAKER, V.P., MICHAELSON, J.A., KIRKLAND, R.J.A.:
The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ("synaptosomes").
Biochem. J. 90: 293-303 (1964)

WHITTAKER, V.P., DOWE, G.H.: The effect of homogenisation conditions on subcellular distribution in brain.
Biochem. Pharmacol. 14: 194 ff (1965)

WHITTAKER, V.P., SHERIDAN, M.N.: The morphology and acetylcholine content of isolated cerebral cortical synaptic vesicles.
J. Neurochem. 12: 363-372 (1965)

WHITTAKER, V.P.: The synaptosome.
In: Handbook of Neurochemistry (A. LAJTHA, Ed.) Vol. 2
pp. 327-364 (Plenum Press New York, 1969)

WHITTAKER, V.P.: Origin and function of synaptic vesicles.
Annals of the New York Academy of Sciences 183: 21-32 (1971)

WHITTAKER, V.P.: The biochemistry of synaptic transmission.
Naturwissenschaften 60: 281-289 (1973)

WOOLLEY, D.W., SHAW, E.: A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders.
Proc. Nat. Acad. Sci. 40: 228-231 (1954)

Lebenslauf

Am 15. 2. 1950 wurde ich als zweites Kind des Oberlandesgerichtsrates Heinz Wildenhahn und seiner Ehefrau Hildegard geb. Peckolt in Stuttgart geboren. Nach Besuch der Volksschule (1956 - 1960) trat ich in das Ev. Heidehof-Gymnasium in Stuttgart ein, wo ich am 28. 5. 1968 das Abitur ablegte. Im ersten Jahr der Apothekenpraktikantenzeit arbeitete ich in der Katharinenhospital-Apotheke, Stuttgart (1. 8. 68 - 31. 7. 69), danach, im 2. Jahr, in der Dr. Lang's-Apotheke, Stuttgart. Die pharmazeutische Vorprüfung bestand ich am 23. 7. 1970. An der Universität Tübingen studierte ich von Oktober 1970 ab Pharmazie und bestand dort am 27. 9. 1973 das Staatsexamen; die Approbation als Apotheker erhielt ich am 18. 10. 1973. Im April 1974 begann ich an der Universität Marburg das Aufbaustudium der Humanbiologie mit dem Hauptfach Biochemie und dem Nebenfach Pharmakologie. Von August 1974 bis Mai 1976 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation.

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

Amon, H., Auterhoff, H., Bader, R.-E., Braun, R., Cyran, W.,
Gallwitz, D., Graf, E., Haberich, F.-J., Karlson, P.,
Kovar, K.-A., von Kraft, A., Krüger, H., Moll, F., Müller, E.,
Niessing, J., Reinhard, E., Rüdorff, W., Schachtschabel, D.,
Schneider, F., Schwick, H.-G., Seifart, K.H., Seiler, H.,
Sewing, K.-F., Siess, M., Uehleke, H., Wesemann, W., Wie-
gandt, H.

